

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**SAYONARA MENDES SILVA**

**MORFOANATOMIA, IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DE  
BIOATIVIDADES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DE FOLHAS, FLORES  
E FRUTOS DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex BENTH., MYRTACEAE**

**CURITIBA**

**2012**

**SAYONARA MENDES SILVA**

**MORFOANATOMIA, IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DE  
BIOATIVIDADES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DE FOLHAS, FLORES  
E FRUTOS DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex BENTH., MYRTACEAE**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tomoe Nakashima

**CURITIBA**

**2012**

Silva, Sayonara Mendes

Morfoanatomia, identificação química e determinação de bioatividades dos óleos essenciais e extratos de folhas, flores e frutos de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth., Myrtaceae / Sayonara Mendes Silva – Curitiba, 2012.

151 f.: il. (algumas color.); 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Tomoe Nakashima

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2012.

Inclui bibliografia

1. 1,8-cineol. 2. Flavonoides e taninos. 3. *ent*-Catequina. 4. Atividades biológicas. 5. Morfoanatomia foliar I. Nakashima, Tomoe. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

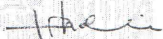
CDD 615.321


## TERMO DE APROVAÇÃO

SAYONARA MENDES SILVA

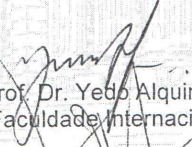
Título: MORFOANATOMIA, IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DE BIOATIVIDADES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS DE FOLHAS, FLORES E FRUTOS DE *EUCALYPTUS CINEREA* F. MUELL. EX BENTH., MYRTACEAE

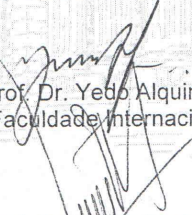
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

  
Profª. Drª. Tomoe Nakashima  
Orientadora

  
Profª. Drª. Dionezine de Fátima Navarro  
(Universidade Estadual de Ponta Grossa)

  
Profª. Drª. Elisa Perez  
(Universidade Estadual do Centro-Oeste)

  
Prof. Dr. Yedo Alquini  
(Faculdade Internacional de Curitiba)

  
Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho  
(Universidade do Vale do Itajaí)

Curitiba, 25 de junho de 2012.

*Dedico este trabalho  
à minha mãe Lucia Hoffmann que é um exemplo de mulher guerreira,  
à minha especial e querida irmã Madiorie Mendes,  
ao meu grande irmão que o admiro Temístocles Augusto Mendes,  
ao meu esposo Tiago Augusto Silva que permaneceu ao meu lado todo instante,  
e ao meu futuro filho.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, benção e luz divina que sempre me guia e me protege. Ele é a minha força, é quem me dá sabedoria, é graças a Ele que cheguei até aqui.

Ao REUNI – Programa de Apoio ao Plano de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais, pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR).

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e à todos professores da área pelo aprendizado durante as disciplinas cursadas.

À orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tomoe Nakashima, pela confiança em mim depositada, e por abrir as portas que possibilitaram a realização deste trabalho científico.

Aos membros de avaliação da banca no exame de qualificação e na defesa final, Prof. Dr. Vadir Cechinel Filho (UNIVALI), Prof. Dr. Yedo Alquini (UFPR/FACINTER), Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dionezine de Fátima Navarro (UEPG) e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisa Perez (UNICENTRO) que contribuíram com sugestões e estímulo para a melhoria desta tese.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello - Departamento de Farmácia/UEM - e sua doutoranda Fernanda G. Bueno, sou muito grata por me receber em seu laboratório de Farmacognosia, pela grande colaboração no isolamento de substâncias, e pelos valiosos ensinamentos para a interpretação dos espectros de RMN obtidos.

Ao Prof. MSc. Antônio Waldir C. da Silva (meu colega de doutorado) e suas alunas Carolina Trochmann Cordeiro e Luiza Carraro - Departamento de Medicina Veterinária/UFPR - pela amizade e colaboração na análise efetuada com animais da Fazenda Canguiri/UFPR.

Ao Prof. Dr. Fábio S. Murakami e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Wanda Wanda Moscalewski Abrahão, pela acolhida e por disponibilizar o laboratório de Controle de Qualidade II - Departamento de Farmácia/UFPR - para a realização da avaliação da atividade antimicrobiana.

Ao Prof. Dr. Geraldo Picheth e ao Prof. MSc. Railson Henneberg, pelo empréstimo das micropipetas de multicanal.

Ao Prof. Dr. Francisco A. Marques e seu doutorando Gustavo Frensch - Departamento de Química/UFPR - por fornecer o equipamento para as análises de CG-EM.

Ao Prof. MSc. João Carlos Possamai - Departamento de Fitotecnia/UFPR - pelo auxílio na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Itamar Francisco Andreazza e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mayumi Eliza Otsuka Sato, por fornecer o laboratório de Tecnologia Farmacêutica - Departamento de Farmácia/UFPR - para a realização de testes de estabilidade do produto.

Ao Prof. Dr. Yedo Alquini pela paciência e pelos conhecimentos botânicos.

Ao taxonomista Prof. Dr. Olavo Guimarães (*in memoriam*) - Departamento de Botânica/UFPR - pela identificação da espécie vegetal em estudo.

Ao Laboratório de Microtécnica Vegetal - Departamento de Botânica/UFPR e ao técnico Sr. Nilson Belém Filho, pela confecção das lâminas permanentes.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica - UFPR, do qual resultaram dados para as análises em MEV.

À técnica-farmacêutica Maria da Graça T. Toledo, da Central Analítica - Departamento de Farmácia/UFPR - pelo apoio com o uso correto dos equipamentos.

À Hilda dos Santos, ex-técnica do laboratório de Fitoquímica - Departamento de Farmácia/UFPR – pela ajuda com a vidraria no início do doutorado.

Ao Departamento de Nutrição/UFPR e ao técnico Sr. Jair José de Lima, pela liofilização dos extratos.

Ao Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel e ao Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber pelo convívio diário no laboratório de Fitoquímica/UFPR.

Aos servidores e funcionários da UFPR.

Entre tantas mudanças de secretária no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, agradeço a atual secretária Juliana de Lima Rodrigues pela sua responsabilidade nas informações solicitadas.

Aos acadêmicos do curso de Farmácia, público o qual permitiu que eu realizasse os Estágios de Docência tanto nas aulas teóricas como práticas.

Aos estagiários: Camila Itchikawa, Pamila S. Inoue, Mariane Augusta D. Rodrigues, Fábio S. Branco, Isis R. C. D. Costa, Caroline S. Hamasaki, Allan V. F. Lourenço, Andrea Beatriz Alves, Suelen Carla Nichelle e Marina W. Pereira; e as alunas de iniciação científica júnior: Tatiane Otto de França e Gabrieli R. A. Abreu, pela convivência durante esta longa caminhada.

À aluna de iniciação científica Simone Yae Abe, pela amizade, confiança e colaboração na realização dos experimentos, e que tornou-se minha melhor amiga, e parceira em todas as horas.

Aos colegas, mestrandos e doutorandos do grupo de pesquisa do laboratório de Fitoquímica/UFPR: Letícia R. L. Malinowski, Claudia Boscheco Moretoni, Rodrigo D. Antonio, Paulo C. Paraná de Oliveira, Priscila G. Sieben, Bárbara Moriel, Grazielle F. Franco, Mariáh B. Baril, Ana Carolina P. Lobo, Stella M. Siu Ló, Antônio Waldir C. da Silva, cuja amizade que se formou permitiu a conquista desta vitória.

Pela companhia de Débora Maria Borsato e Patrícia Mathias Döll Boscardin nas difíceis e intermináveis aulas de RMN.

Às minhas amigas farmacêuticas do cotidiano: Juliane C. Müller, Rossana Koehler, Taísa Adamowicz, pelo carinho e pelos momentos de descontração.

À todos meus familiares e amigos pelo apoio concedido.

À minha mãe que mesmo residindo em Ponta Grossa-PR, através das longas conversas por telefone, sempre me incentivou com suas sábias palavras e transmitiu conforto e tranquilidade nos momentos de angústias e desânimo.

À minha especial irmã, a qual considero um ser humano extremamente evoluído, e com seu sorriso puro e transparente aprendo com ela o verdadeiro significado da vida.

Ao meu irmão, pela imensa saudades que sinto, sentimento este que torna-se cada vez mais intenso, mesmo morando no exterior a quilômetros de distância jamais deixou de estar presente em meus pensamentos. E também pela ajuda fornecida como guia turístico no período que estive apresentando trabalho científico na Europa.

Sou grata ao meu esposo, que além de companheiro me ajudou nas correções ortográficas desta tese, na formatação de algumas tabelas e gráficos; pela sua compreensão nos períodos que me ausentei de casa, nos fins de semana e feriados em que deixei de dar-lhe atenção em função do doutorado; e pelo seu grandioso e verdadeiro amor.

Ao meu futuro projeto de vida que foi adiado até que finalizasse o doutorado, e soube esperar para que pudesse ser gerado – um filho.

À todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.



“Tua caminhada ainda não terminou....

A realidade te acolhe  
dizendo que pela frente  
o horizonte da vida necessita  
de tuas palavras  
e do teu silêncio.

Se amanhã sentires saudades,  
lembra-te da fantasia e  
sonha com tua próxima vitória.  
Vitória que todas as armas do mundo  
jamais conseguirão obter,  
porque é uma vitória que surge da paz  
e não do ressentimento.

É certo que irás encontrar situações  
tempestuosas novamente,  
mas haverá de ver sempre  
o lado bom da chuva que cai  
e não a faceta do raio que destrói.

Tu és jovem.  
Atender a quem te chama é belo,  
lutar por quem te rejeita  
é quase chegar a perfeição.  
A juventude precisa de sonhos  
e se nutrir de lembranças,  
assim como o leito dos rios  
precisa da água que rola  
e o coração necessita de afeto.

Não faças do amanhã  
o sinônimo de nunca,  
nem o ontem te seja o mesmo  
que nunca mais.  
Teus passos ficaram.  
Olhes para trás...  
mas vá em frente  
pois há muitos que precisam  
que chegues para poderem seguir-te.”

(Charles Chaplin)

## RESUMO

*Eucalyptus cinerea* é nativa da Austrália com adequada aclimação no sul do Brasil, e suas folhas aromáticas são utilizadas para fins ornamentais. Possui poucos relatos de uso na medicina tradicional e apresenta grande potencial para produção de óleo essencial. O presente trabalho teve como objetivo analisar a morfoanatomia foliar, realizar a caracterização química, e determinar bioatividades (antioxidante, antimicrobiana e antiparasitária) dos óleos essenciais e dos extratos das partes aéreas separadamente – folhas, flores e frutos – de *E. cinerea*. O material vegetal foi coletado sazonalmente, no Centro Politécnico – UFPR, Curitiba, Paraná. A partir de métodos usuais de microscopia óptica e eletrônica de varredura, foram evidenciados estômatos anomocíticos em ambas as faces, ausência de tricomas, mesofilo heterogêneo simétrico, feixe vascular da nervura central do tipo bicolateral, presença de cristais de oxalato de cálcio e cavidades secretoras, e grande quantidade de cera epicuticular cristalóide em forma de túbulo. Através da hidrodestilação, foi obtido um rendimento de 5,02% para o óleo volátil das folhas secas na coleta de verão. Os compostos majoritários dos óleos essenciais identificados por CG/EM, para folhas, flores e frutos com variação sazonal foram: 1,8-cineol [destacando folhas frescas – primavera (74,99%), folhas secas – primavera (85,32%), flores – inverno (78,76%) e frutos – inverno (80,96%)],  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\alpha$ -terpineol e acetato de  $\alpha$ -terpinila. As amostras apresentaram consideráveis valores de compostos fenólicos. Com o uso do reagente Folin-Ciocalteu, mostrou-se que o conteúdo de fenois totais nos extratos acetônicos foi superior ao dos extratos etanólicos para folhas, flores e frutos. O maior teor de flavonoides totais foi verificado para o extrato das folhas (0,77%), enquanto que o maior teor de taninos totais foi observado no extrato das flores (4,72%). Através das técnicas empregadas CCD, CC, CCCAV obteve-se o isolamento e a purificação de substâncias. As substâncias isoladas foram analisadas através de RMN 1D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e 2D (COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$ ), polarimetria e dicroísmo circular, considerando-se que o composto isolado denominado F1-2#10 foi identificado como *ent*-catequina, descrito pela primeira vez no gênero e na espécie em estudo. Os melhores resultados da atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio foram para os extratos aquosos das folhas (21% na concentração 300  $\mu\text{g/mL}$ ) e dos frutos (24% na concentração 200  $\mu\text{g/mL}$ ) em relação ao ácido ascórbico. Para a atividade antioxidante avaliada pelo DPPH, a quantidade de extrato etanólico necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) resultou em 80, 69 e 35  $\mu\text{g/mL}$  para folhas, flores e fração semipurificada FAE, respectivamente – valores significativos quando comparados ao controle  $\text{CE}_{50}$  da rutina (105,18  $\mu\text{g/mL}$ ). Os óleos essenciais, os extratos orgânicos (hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol, etanol 70% e etanol 50%) de folhas, flores e frutos, e a fração semipurificada FAE de *E. cinerea* apresentaram efeito antimicrobiano frente a cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e de *Candida albicans*, o que foi comprovado através dos métodos de difusão em disco e da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima – CIM. No ensaio antiparasitário contra ectoparasitas em aves (*Columba livia*), o produto contendo o óleo essencial em estudo demonstrou uma possível ação antiparasitária contra estes parasitos (piolho de pombo - ordem Phthiraptera). Os testes preliminares de estabilidade da formulação contendo óleo de *E. cinerea* evidenciaram que o produto é capaz de se manter estável ao longo de pelo menos 6 meses. Os resultados indicam que esta espécie vegetal apresenta um potencial químico-biológico na indústria com aplicabilidades em farmácia, nutrição, cosmetologia, medicina veterinária e outras áreas afins.

Palavras-chave: 1,8-cineol, flavonoides e taninos, *ent*-catequina, atividades biológicas, morfoanatomia foliar, estabilidade de formulação.

## ABSTRACT

*Eucalyptus cinerea* is native to Australia and rightly acclimatized to southern Brazil, and its aromatic leaves are used for ornamental purposes. There are few reports of its use in folk medicine and it has great potential for producing essential oil. This study aimed to analyze the leaves morpho-anatomy, perform chemical characterization, and determine bioactivities (antioxidant, antimicrobial and antiparasitic) of the essential oils and extracts of aerial parts – leaves, flowers and fruits – of *E. cinerea*. The plant material was seasonally collected at Centro Politécnico - UFPR, Curitiba, Paraná. Usual methods of optical and scanning electron microscopy showed anomocytic stomata on both leaf surfaces, absence of trichomes, symmetrical heterogeneous mesophyll, bicollateral midrib, presence of crystals of calcium oxalate and secretory cavities, besides large amounts of tubule-shaped crystalloid epicuticular wax. A yield of 5.02% was obtained by hydrodistillation for the volatile oil from dried leaves collected in the summer. The major constituents of essential oils identified by GC/MS for leaves, flowers and fruits with seasonal variation were: 1,8-cineole [highlighting fresh leaves - spring (74.99%), dried leaves - spring (85.32%), flowers - winter (78.76%) and fruits - winter (80.96%)],  $\alpha$ -pinene, limonene,  $\alpha$ -terpineol and  $\alpha$ -terpinil acetate. The samples presented high amounts of phenolic compounds. Using the Folin-Ciocalteu reagent, it was shown that the total phenolic content was higher for the acetone extract than for the ethanol extracts of leaves, flowers and fruits. The highest content of total flavonoids was seen in the extract of leaves (0.77%), while the highest content of total tannins was observed in the extract of flowers (4.72%). Through the TLC, CC and HSCCC techniques the isolation and purification of substances were obtained. The isolated compounds were analyzed by 1D NMR ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ), 2D NMR ( $^1\text{H}/^1\text{H}$  COSY), polarimetry and circular dichroism, identifying the isolated substance named F1-2#10 as *ent*-catechin, first described in the genus and in the species under study. The best results for antioxidant activity by the phosphomolybdenum method were observed in the aqueous extracts of leaves (21% at concentration of 300  $\mu\text{g/mL}$ ) and fruits (24% at concentration of 200  $\mu\text{g/mL}$ ) relative to the ascorbic acid. Regarding the antioxidant activity by DPPH, the necessary amount of ethanol extract to decrease the initial DPPH concentration by 50% ( $\text{EC}_{50}$ ) resulted in 80, 69 and 35  $\mu\text{g/mL}$  for leaves, flowers and substance F10 respectively - significant values when compared with the  $\text{EC}_{50}$  of rutin (105.18  $\mu\text{g/mL}$ ). Essential oils, organic extracts (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol, ethanol 70% and ethanol 50%) from leaves, flowers and fruits, and the semi-purified fraction FAE of *E. cinerea* showed antimicrobial activity against strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria and *Candida albicans*, which was confirmed by disk diffusion and microdilution methods for determining the minimum inhibitory concentration – MIC. In the antiparasitic essay against ectoparasites in birds (*Columba livia*), the product containing the essential oil under study showed a possible antiparasitic action against these parasites (pigeon lice - order Phthiraptera). Preliminary tests of stability performed with a formulation containing *E. cinerea* oil showed that the product is able to remain stable over at least six months. The results evidence that this plant species presents a chemical-biological potential at industry and other applications like pharmacy, nutrition, cosmetology and veterinary medicine and other related areas.

**Keywords:** 1,8-cineole, flavonoids and tanins, catechin, biological activities, leaf morphoanatomy, formulation stability.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 -	NÚCLEO FUNDAMENTAL DE FLAVONOIDES.....	32
FIGURA 02 -	ESTRUTURA DOS DOIS PRINCIPAIS TIPOS DE TANINOS....	34
FIGURA 03 -	<i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. ex BENTH., ASPECTO DA ÁRVORE EM SEU HÁBITAT.....	36
FIGURA 04 -	FOLHAS DE <i>E. cinerea</i> .....	37
FIGURA 05 -	INFLORESCÊNCIA DE <i>E. cinerea</i> .....	37
FIGURA 06 -	BOTÕES FLORAIS DE <i>E. cinerea</i> .....	38
FIGURA 07 -	FRUTOS DE <i>E. cinerea</i> .....	38
FIGURA 08 -	APARELHO DE CLEVENGER.....	43
FIGURA 09 -	APARELHO DE SOXHLET UTILIZADO PARA EXTRAÇÃO POR SEQUÊNCIA DE SOLVENTES COM POLARIDADE CRESCENTE .....	46
FIGURA 10 -	CCD ASPECTO GERAL DAS FRAÇÕES 165 A 180 OBTIDAS NA CCCAV.....	52
FIGURA 11 -	PADRONIZAÇÃO DA MICROPLACA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	61
FIGURA 12 -	<i>E. cinerea</i> – MORFOLOGIA EXTERNA: A. DESTAQUE DO RAMO FOLIAR; B. ASPECTO DAS FOLHAS MOSTRANDO SUPERFÍCIE ADAXIAL (AD) E ABAXIAL (AB).....	66
FIGURA 13 -	VENAÇÃO DA FOLHA DE <i>E. cinerea</i> : A. PADRÃO GERAL; B. VÊNULAS NA REGIÃO INDICADA PELO RETÂNGULO NA FIG. 13-A.....	67
FIGURA 14 -	SECÇÕES PARADÉRMICAS DAS FACES ADAXIAL (AD) SEM CORANTE E ABAXIAL (AB) COM CORANTE DA FOLHA DE <i>E. cinerea</i> COM DESTAQUE AOS ESTÔMATOS ANOMOCÍTICOS (ES) E CÉLULAS EPIDÉRMICAS .....	70
FIGURA 15 -	SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA PRINCIPAL DA FOLHA DE <i>E. cinerea</i> , CAVIDADE SECRETORA (CS), CUTÍCULA (CU), EPIDERME PAPILOSA ADAXIAL (EP-AD), EPIDERME PAPILOSA ABAXIAL (EP-AB), PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO (PP), PARÊNQUIMA LACUNOSO (PL) E SISTEMA VASCULAR (SV) .....	71

FIGURA 16 -	DETALHE DA NERVURA CENTRAL DE <i>E. cinerea</i> MOSTRANDO SISTEMA VASCULAR, DESTACANDO FEIXE VASCULAR BICOLATERAL, FLOEMA (FL), XILEMA (XL), FAIXA CAMBIAL (FC), BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA (BE), E CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO (CR) .....	71
FIGURA 17 -	SECÇÃO TRANSVERSAL DO LIMBO EVIDENCIANDO O FEIXE VASCULAR, XILEMA (XL), FLOEMA (FL), CÉLULAS ESCLERÊNQUIMÁTICAS (ESC), CÉLULAS COLÊNQUIMÁTICAS (COL), CRISTAIS OXALATO DE CÁLCIO (CR), EPIDERME ADAXIAL (EP-AD) E EPIDERME ABAXIAL (EP-AB) .....	72
FIGURA 18 -	SECÇÃO TRANSVERSAL DA MARGEM DA LÂMINA FOLIAR DE <i>E. cinerea</i> EVIDENCIANDO IDIOBLASTOS CONTENDO CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO (CR), CUTÍCULA (CU) E EPIDERME PAPILOSA (EP) .....	73
FIGURA 19 -	CAVIDADES SECRETORAS (CS) DE ÓLEO ESSENCIAL COM FORMATO ARREDONDADO .....	73
FIGURA 20 -	FOTOMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE ADAXIAL (AD) E ABAXIAL (AB) DA FOLHA DE <i>E. cinerea</i> (MEV), DESTACANDO PRESENÇA DE CERA EPICUTICULAR (CE), ESTÔMATO ANOMOCÍTICO (ES) E PAREDE PERICLINAL EXTERNA DAS CÉLULAS EPIDÉRMICAS PAPILOSAS .....	74
FIGURA 21 -	MEV ILUSTRANDO CERA EPICUTICULAR TUBULAR DA FACE ADAXIAL (AD) E ABAXIAL (AB) .....	75
FIGURA 22 -	RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS, FLORES E FRUTOS DE <i>E. cinerea</i> COM VARIAÇÃO SAZONAL .....	77
FIGURA 23 -	CROMATOGRAMAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>E. cinerea</i> : COLETA DE OUTONO .....	83
FIGURA 24 -	CROMATOGRAMAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>E. cinerea</i> : COLETA DE INVERNO .....	84
FIGURA 25 -	CROMATOGRAMAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>E. cinerea</i> : COLETA DE PRIMAVERA .....	85
FIGURA 26 -	CROMATOGRAMAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>E. cinerea</i> : COLETA DE VERÃO .....	85
FIGURA 27 -	ESPECTROS DE MASSAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS IDENTIFICADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>E. cinerea</i> .....	86

FIGURA 28 -	FRAGMENTAÇÃO TIPO REAÇÃO <i>retro</i> -DIELS-ALDER DO LIMONENO.....	87
FIGURA 29 -	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO OBSERVADO PARA O COMPOSTO 1,8-CINEOL.....	88
FIGURA 30 -	DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES E TANINOS TOTAIS PRESENTES NOS EXTRATOS DE FOLHAS, FRUTOS E FLORES DE <i>E. cinerea</i> .....	95
FIGURA 31 -	ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ NO ESTADO SÓLIDO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	98
FIGURA 32 -	REPRESENTAÇÃO DE ESTRUTURAS QUÍMICAS.....	99
FIGURA 33 -	ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$ DA SUBSTÂNCIA F1-2#10 (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ; RELATIVO PARA TMS) .....	102
FIGURA 34 -	ESPECTRO COSY ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ ) DA SUBSTÂNCIA F1-2#10 (300 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ ; RELATIVO PARA TMS) .....	104
FIGURA 35 -	ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ DA SUBSTÂNCIA F1-2#10 (75 MHz; $\text{CD}_3\text{OD}$ RELATIVO AO TMS) .....	107
FIGURA 36 -	REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA CATEQUINA .....	109
FIGURA 37 -	ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR DA SUBSTÂNCIA F1-2#10.....	110
FIGURA 38 -	ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA ISOLADA F1-2#10 DAS FOLHAS DE <i>E. cinerea</i> : <i>ENT</i> -CATEQUINA, EM COMPARAÇÃO COM A (+)-CATEQUINA.....	110
FIGURA 39 -	CURVA ANALÍTICA DO DPPH .....	113
FIGURA 40 -	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE <i>E. cinerea</i> (FOLHAS, FRUTOS, FLORES) E DOS CONTROLES, NAS CONCENTRAÇÕES DE 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ , ATRAVÉS DO MÉTODO DPPH .....	114
FIGURA 41 -	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FAE DE <i>E. cinerea</i> E DOS CONTROLES, NAS CONCENTRAÇÕES DE 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ , ATRAVÉS DO MÉTODO DPPH .....	114
FIGURA 42 -	$\text{DPPH}_{\text{REM}}$ PELA CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>E. cinerea</i> PARA O CÁLCULO DO $\text{CE}_{50}$ ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA .....	116
FIGURA 43 -	$\text{DPPH}_{\text{REM}}$ PELA CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DOS FRUTOS DE <i>E. cinerea</i> PARA O CÁLCULO DO $\text{CE}_{50}$	

	ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA .....	116
FIGURA 44 -	DPPH <sub>REM</sub> PELA CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DAS FLORES DE <i>E. cinerea</i> PARA O CÁLCULO DO CE <sub>50</sub> ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA .....	117
FIGURA 45 -	DPPH <sub>REM</sub> PELA CONCENTRAÇÃO DA FAE DE <i>E. cinerea</i> PARA O CÁLCULO DO CE <sub>50</sub> ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA .....	117
FIGURA 46 -	DPPH <sub>REM</sub> PELA CONCENTRAÇÃO DA RUTINA PARA O CÁLCULO DO CE <sub>50</sub> ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA .....	118
FIGURA 47 -	DPPH <sub>REM</sub> PELA CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO PARA O CÁLCULO DO CE <sub>50</sub> ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA .....	118
FIGURA 48 -	PERFIL DO pH DURANTE OS TESTES DE ESTABILIDADE OBTIDO DAS AMOSTRAS DE SOLUÇÃO COM 0,3% DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. cinerea</i> , SUBMETIDAS À TEMPERATURA AMBIENTE, ESTUFA 40 °C E SOB REFRIGERAÇÃO 4 °C, EM QUATRO DIFERENTES TIPOS DE EMBALAGENS .....	133
FIGURA 49 -	PERFIL DO pH DURANTE OS TESTES DE ESTABILIDADE OBTIDO DAS AMOSTRAS DE SOLUÇÃO COM 3% DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. cinerea</i> , SUBMETIDAS À TEMPERATURA AMBIENTE, ESTUFA 40 °C E SOB REFRIGERAÇÃO 4 °C, EM QUATRO DIFERENTES TIPOS DE EMBALAGENS .....	134



## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. ex BENTH., SEGUNDO ENGLER (1964) E CRONQUIST (1981).....	39
TABELA 02 -	SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DA ESPÉCIE EM ESTUDO SEGUNDO APG II.....	39
TABELA 03 -	COMPONENTES DA FORMULAÇÃO LÍQUIDA E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES.....	63
TABELA 04 -	DETERMINAÇÃO DE ÁGUA NAS FOLHAS FRESCAS DE <i>E. cinerea</i> .....	76
TABELA 05 -	DENSIDADE RELATIVA, ÍNDICE DE REFRAÇÃO E PODER ROTATÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS PARTES AÉREAS DE <i>E. cinerea</i> .....	79
TABELA 06 -	SOLUBILIDADE EM ETANOL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DOS ÓRGÃOS VEGETAIS DE <i>E. cinerea</i> .....	80
TABELA 07 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS PARTES AÉREAS DE <i>E. cinerea</i> COM VARIAÇÃO SAZONAL..	82
TABELA 08 -	RENDIMENTO (g) DOS EXTRATOS ORGÂNICOS OBTIDOS ATRAVÉS DE FOLHAS, FRUTOS E FLORES DE <i>E. cinerea</i> , PARTINDO DE 100 g DE CADA ÓRGÃO VEGETAL.....	89
TABELA 09 -	ANÁLISE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS E/OU FRAÇÕES.....	91
TABELA 10 -	ANÁLISE DOS EXTRATOS AQUOSOS.....	92
TABELA 11 -	FENÓIS TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E ACETÔNICOS DAS PARTES AÉREAS DE <i>E. cinerea</i> .....	93
TABELA 12 -	DESLOCAMENTO DA SUBSTÂNCIA F1-2#10 (300 MHz; CD <sub>3</sub> OD RELATIVO PARA TMS).....	101
TABELA 13 -	RMN <sup>13</sup> C COMPARATIVA DA AMOSTRA (δ1) E OBTIDO POR CREN-OLIVÉ <i>et al.</i> (2002) (δ2).....	106
TABELA 14 -	AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	112
TABELA 15 -	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO DPPH.....	114

TABELA 16 -	CE <sub>50</sub> DOS EXTRATOS E DA FAE DE <i>E. cinerea</i> NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH.....	115
TABELA 17 -	DIFUSÃO EM DISCO COM DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	120
TABELA 18 -	CIM (mg/mL) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS, FLORES E FRUTOS DE <i>E. cinerea</i> .....	123
TABELA 19 -	DIFUSÃO EM DISCO COM DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm) DOS EXTRATOS.....	125
TABELA 20 -	DIFUSÃO EM DISCO COM DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm) DA FAE.....	126
TABELA 21 -	CIM (mg/mL) DOS EXTRATOS DE FOLHAS, FLORES E FRUTOS DE <i>E. cinerea</i> .....	129
TABELA 22 -	CIM (mg/mL) DA FAE DE <i>E. cinerea</i> .....	129
TABELA 23 -	CONCENTRAÇÃO DE HEMATÓCRITO EM AVES.....	131
TABELA 24 -	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ORGANOLÉPTICOS DA SOLUÇÃO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. cinerea</i> .....	132

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%AA	porcentagem de atividade antioxidante
$\delta$	deslocamento químico
$\varnothing$	diâmetro
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrômetro
Abs	absorvância
ATCC	American Type Culture Collection
CC	cromatografia em coluna
CCCAV	cromatografia em contra corrente de alta velocidade
CCD	cromatografia em camada delgada
$\text{CD}_3\text{OD}$	metanol deuterado
$\text{CE}_{50}$	concentração necessária para reduzir em 50% o DPPH
CG	cromatografia gasosa
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM	concentração inibitória mínima
cm	centímetro
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
DPPH	radical livre 1,1-difenil-2-picrilidrazila
$\text{DPPH}_{\text{REM}}$	DPPH remanescente
EAG	equivalentes de ácido gálico
EB	extrato bruto
<i>et al.</i>	expressão latina abreviada <i>et alli</i> , (=e outros)
FAA	fixador de tecidos vegetais constituído de formol, ácido acético e álcool etílico
FA	fração aquosa
FAE	fração acetato de etila
$\text{FeCl}_3$	cloreto férrico
g	grama
h	altura
Hz	hertz
IK	índice de Kováts
<i>J</i>	constante de acoplamento
kg	quilograma
L	litro
m	metro
M	molar
m/m	massa por massa
m/v	massa por volume
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg	miligrama
MHz	megahertz
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro

mmol	milimol
N	normal
nm	nanômetro
O	oeste
PET	polietileno de tereftalato
PNA	polifenóis não adsorventes
PT	polifenóis totais
p/p	peso por peso
p/v	peso por volume
ppm	partes por milhão
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p	quantidade suficiente para
R <sup>2</sup>	coeficiente de correlação
REUNI	Reestruturação e Expansão das Universidades Federais
RMN 1D	ressonância magnética unidimensional
RMN 2D	ressonância magnética bidimensional
RMN - <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN - <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de carbono
RMN COSY	ressonância magnética nuclear com correlação de espectroscopia
RMN MAS	ressonância magnética nuclear com rotação no ângulo mágico
RMN CP-MAS	ressonância magnética nuclear de polarização cruzada com rotação no ângulo mágico
rpm	rotações por minuto
S	sul
SM	solução mãe
sp.	relativo a espécie do gênero
ssp.	subespécie
TMS	tetrametilsilano
TT	taninos totais
TTC	cloreto de trifenil tetrazólio
UFC	unidade formadora de colônia
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UV	ultravioleta
v/v	volume por volume
v/m	volume por massa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	24
<b>2 OBJETIVOS</b>	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>	27
3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE	27
3.2 GÊNERO <i>Eucalyptus</i>	27
3.3 FENÓIS TOTAIS	31
3.3.1 Flavonoides	31
3.3.2 Taninos	33
3.4 <i>Eucalyptus cinerea</i> F. MUELL. ex BENTH.	35
3.4.1 Enquadramento taxonômico	39
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	40
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	40
4.2 MORFOANATOMIA	40
4.2.1 Preparo do material	40
4.2.2 Clarificação das folhas	41
4.2.3 Preparo de lâminas semipermanentes	41
4.2.4 Preparo de lâminas permanentes	41
4.2.5 Testes microquímicos	42
4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	42
4.3 DETERMINAÇÃO DE ÁGUA	42
4.4 EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS	43
4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	44
4.5.1 Determinação da densidade relativa	44
4.5.2 Determinação do índice de refração	44
4.5.3 Determinação do poder rotatório	44
4.5.4 Determinação da solubilidade em etanol	44
4.6 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)	44
4.7 OBTENÇÃO DE EXTRATOS ORGÂNICOS	46

4.7.1 Extração através de Soxhlet .....	46
4.7.2 Extração por refluxo .....	47
4.8 ANÁLISE DAS FOLHAS, FLORES E FRUTOS E DE <i>E. cinerea</i> .....	47
4.8.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20% (p/v) .....	47
4.8.1.1 Obtenção das frações .....	47
4.8.1.2 Pesquisa de metabólitos secundários .....	48
4.8.2 Preparo do extrato aquoso a 20% (p/v) .....	48
4.8.2.1 Pesquisa de metabólitos secundários .....	48
4.9 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS .....	48
4.10 DOSEAMENTO .....	49
4.10.1 Doseamento de flavonoides .....	50
4.10.2 Doseamento de taninos .....	50
4.11 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS.....	50
4.11.1 Extrato bruto .....	50
4.11.2 Fração acetato de etila .....	51
4.11.3 Cromatografia em coluna (CC) .....	51
4.11.4 Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	52
4.11.5 Partição da F1 .....	52
4.11.6 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV) .....	53
4.11.7 Análise estrutural .....	53
4.11.8 Rotação ótica (polarimetria) .....	54
4.11.9 Espectroscopia de dicroísmo circular .....	54
4.11.10 Fluxograma .....	55
4.12 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	56
4.12.1 Método fosfomolibdênio .....	56
4.12.2 Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) .....	56
4.13 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	58
4.13.1 Método de difusão em disco .....	59
4.13.2 Método de microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	59
4.14 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA .....	62
4.15 ESTUDOS DA FORMULAÇÃO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>E. cinerea</i> .....	62

4.15.1 Preparação da formulação .....	62
4.15.2 Testes de estabilidade preliminares da formulação .....	63
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	63
<b>5 RESULTADOS</b> .....	65
5.1 MORFOANATOMIA .....	65
5.1.1 Descrição macroscópica .....	65
5.1.2 Descrição microscópica .....	67
5.2 DETERMINAÇÃO DE ÁGUA DAS FOLHAS DE <i>E. cinerea</i> .....	76
5.3 RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>E. cinerea</i> .....	76
5.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	78
5.5 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS - CG/EM .....	80
5.6 RENDIMENTO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS .....	89
5.7 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DAS FOLHAS, FRUTOS E FLORES DE <i>E.</i> <i>cinerea</i> .....	89
5.8 FENÓIS TOTAIS .....	92
5.9 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES E TANINOS .....	93
5.10 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO .....	96
5.10.1 Fração acetato de etila .....	96
5.10.2 Substância F1-2#10: <i>ent</i> -catequina .....	100
5.11 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO .....	111
5.12 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DO DPPH .....	112
5.13 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	119
5.13.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>E. cinerea</i> .....	119
5.13.1.1 Difusão em disco dos óleos essenciais .....	119
5.13.1.2 CIM - Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais .....	120
5.13.2 Atividade antimicrobiana dos extratos e da FAE de <i>E. cinerea</i> .....	123
5.13.2.1 Difusão em disco dos extratos e da FAE.....	123
5.13.2.2 CIM - Concentração Inibitória Mínima dos extratos e da FAE .....	126
5.14 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA .....	130
5.15 ENSAIOS DE ESTABILIDADE .....	131
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	136
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	138

## 1 INTRODUÇÃO

Em muitas comunidades e grupos étnicos, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza geralmente o único recurso terapêutico. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares (como a botânica, a fitoquímica, a farmacologia, entre outras), que enriquecem os conhecimentos científicos sobre a inesgotável fonte medicinal natural (MACIEL *et al.*, 2002).

Em diversas partes do mundo, várias espécies vegetais de *Eucalyptus* vêm sendo cultivadas e exploradas há muitos anos. Originário da Austrália, o eucalipto é um vegetal que se destaca tanto por seu valor econômico – onde se ressalta o uso na indústria madeireira, a qual aproveita as qualidades de diversas espécies para os mais variados fins – como do ponto de vista de suas virtudes medicinais – o óleo essencial extraído das folhas do eucalipto carrega o benefício das seguintes propriedades terapêuticas: antiparasitária, antimicrobiana, antifúngica, antisséptica, adstringente, anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante, repelente, desinfetante e expectorante (HAJJI, FKIH-TETOUANI, TANTAOUI-ELARAKI, 1993; OLIVEIRA, AKISUE, 1997; ESTANISLAU *et al.*, 2001; MALINOWSKI, NAKASHIMA, ALQUINI, 2009).

Pesquisas realizadas sobre o gênero *Eucalyptus* e suas espécies mais conhecidas, evidenciaram que existem várias patentes com aplicações significativas em diversas áreas como farmácia, cosmetologia, nutrição, agropecuária, medicina alternativa e medicina veterinária (DE SOUZA CHAGAS, CERQUEIRA LEITE, TEIXEIRA PRATES, 2004a e b; KITAGAWA, 2005; TESSMANN, 2007; LUCIA *et al.*, 2007; ZHU, 2008; CHU, 2008; LEITE DENADAI *et al.*, 2008).

O principal constituinte encontrado no óleo essencial proveniente das folhas é o monoterpeno 1,8-cineol, informação comprovada em estudos realizados com diversas espécies de *Eucalyptus* em diferentes países, como Marrocos, Irã e Nigéria (OGUNWANDE *et al.*, 2003; ZRIRA *et al.*, 2004; ASSAREH, JAIMAND, REZAEI, 2007).

Além de 1,8-cineol, é comum encontrar também compostos flavônicos, taninos, ácidos, e princípios amargos, dentre outros nos representantes do gênero *Eucalyptus* (COSTA, 1986).



Pertencentes à classe de compostos fenólicos, os flavonoides e taninos constituem um grupo de metabólitos que possuem destaque por apresentarem potencial farmacológico e merecem investigações mais acuradas.

Por apresentar esta diversidade de componentes químicos, o óleo essencial e os extratos de *Eucalyptus* são responsáveis por várias atividades biológicas, muitas vezes relacionadas a usos tradicionais (COSTA, 1986; ESTANISLAU *et al.*, 2001).

Com a espécie em estudo *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth., praticamente existem poucos relatos de uso na medicina popular. Empregada essencialmente para fins ornamentais, apresenta um rendimento de óleo essencial superior ao das demais espécies de eucalipto (MOREIRA *et al.*, 1980).

A presente pesquisa propõe analisar os óleos essenciais e os extratos e averiguar as bioatividades, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*; o isolamento de metabólitos ativos de óleos essenciais e de extratos provenientes das partes aéreas de *Eucalyptus cinerea*, não apenas das folhas como também das flores e frutos. Os resultados destes ensaios são essenciais para elaboração de um perfil químico-biológico. Esta espécie vegetal tão pouco conhecida cientificamente apresenta-se como um foco promissor para o estudo, justificando a realização de pesquisas ao seu respeito.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho teve como objetivo analisar a morfoanatomia, realizar a identificação química, e determinar a bioatividade dos óleos essenciais e dos extratos das partes aéreas – folhas, flores e frutos – de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Efetuar coletas sazonais das partes aéreas – folhas, flores e frutos – de *E. cinerea*;
- Analisar o estudo morfoanatômico das folhas dos elementos constituintes;
- Realizar a extração, o rendimento e as análises físico-químicas dos óleos essenciais;
- Identificar a composição química dos óleos essenciais por CG/EM;
- Obter extratos dos órgãos vegetais – folhas, flores e frutos, utilizando uma sequência de solventes com polaridade crescente;
- Verificar as principais classes de metabólitos nos extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas, flores e frutos;
- Determinar os fenóis totais;
- Efetuar o doseamento de flavonoides e taninos totais;
- Isolar e purificar os principais compostos por métodos cromatográficos (CCD, CC, CCCAV), além de realizar a elucidação estrutural por RMN-1D e 2D, polarimetria e dicroísmo circular dos compostos isolados;
- Verificar o potencial antioxidante dos extratos e da fração semipurificada acetato de etila (FAE);
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, dos extratos e da fração semipurificada acetato de etila (FAE);
- Analisar a atividade antiparasitária *in vivo* do óleo essencial das folhas de *E. cinerea* frente à ectoparasitos presentes em animais.
- Correlacionar resultados de composição química e bioatividade para uma possível aplicação terapêutica de um produto natural;
- Avaliar testes de estabilidade preliminares de uma formulação farmacêutica.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae contém cerca de 100 gêneros com 3.000 a 3.500 espécies distribuídas por quase todos os continentes, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais da América e Austrália (JOLY, 1998; FABROWSKI, 2002).

Dentre seus principais gêneros, destacam-se *Melaleuca*, *Eugenia*, *Psidium* e *Eucalyptus*, sendo o último um dos maiores gêneros desta família (CRONQUIST, 1981). As espécies são cultivadas com diversas finalidades como: produção de frutos comestíveis, fonte de madeira e lenha, extração de óleos essenciais e, pela bela aparência de algumas espécies, são utilizadas para efeito ornamental (SIANI *et al.*, 2000).

Segundo Cruz e Kaplan (2004), cerca de 70% das espécies pertencentes à família Myrtaceae são empregadas para fins medicinais, sendo as folhas, as cascas e os frutos, as partes mais utilizadas destas espécies. Além disso, diversos trabalhos científicos contemporâneos têm respaldado o uso popular de espécimes dos diversos gêneros de Myrtaceae, por meio de diferentes investigações farmacognósticas, relacionadas aos aspectos botânicos, fitoquímicos e de atividades biológicas (CRUZ, KAPLAN, 2004; MALINOWSKI, NAKASHIMA, ALQUINI, 2009; BOSCARDIN *et al.*, 2010).

#### 3.2 GÊNERO *Eucalyptus*

*Eucalyptus* foi denominado por L'Heritier em 1788. Esta palavra deriva do grego *eu* (=bem) e *kalypto* (=cobrir) em alusão ao opérculo que cobre as sementes até que estejam totalmente desenvolvidas (GUENTHER, 1977).

O gênero *Eucalyptus* contém mais de 700 espécies encontradas principalmente na Austrália, tendo espécies introduzidas em mais de 90 países desde 1850. Devido ao grande número de espécies, este gênero foi dividido em subgêneros: *Corymbia* (30 espécies); *Monocalyptus* (80 espécies) e *Symphomyrtus* (250 espécies) (HÄNSEL *et al.*, 1992; AMEN-CHEN, PAKDEL, ROY, 1997; FABROWSKI, 2002; MONTAGU, KEARNEY, SMITH, 2003).

Em 1865 o *Eucalyptus* fixou-se no Brasil, inicialmente com a espécie *Eucalyptus globulus* Labill., da qual utilizavam-se as folhas adultas pecioladas e lanceoladas para extração de óleo essencial (GUENTHER, 1977; COSTA, 1986).

Além do *Eucalyptus globulus* destacam-se também no território brasileiro as espécies *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus smithii*, como importante fonte de óleo essencial, empregado na área medicinal e farmacêutica. Na área econômica e ambiental, os eucaliptos mais utilizados para produção de madeira, fabricação de celulose e papel são: *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus urophylla* (ESTANISLAU *et al.*, 2001; FABROWSKI, 2002).

Estudos demonstraram que o perfil químico de várias espécies de *Eucalyptus* produtoras de óleo essencial proveniente das folhas consiste em alta ocorrência de uma mistura de terpenos com 70 a 80% de 1,8-cineol (ASSAREH, JAIMAND, REZAEI, 2007; ZRIRA *et al.*, 2004). Quando se trata de óleo essencial de frutos coletados de *E. globulus*, em Portugal, o maior componente identificado foi aromadendreno com 25,1% (PEREIRA *et al.*, 2005). Estas evidências indicam diferenças na composição química do óleo essencial dependendo do órgão vegetal coletado.

O efeito de fatores físicos (aquecimento, exposição à luz solar, luz ultravioleta, entre outros) na composição química do óleo essencial de folhas *E. citriodora* também produziu variação nas concentrações dos compostos (SULTANA *et al.*, 2008). Além disso, na região da Tunísia o estudo qualitativo e quantitativo do óleo essencial das folhas de sete espécies de *Eucalyptus* coletadas em dois períodos (junho/2004 e janeiro/2005) mostrou que os melhores rendimentos do óleo essencial foram registrados na colheita de janeiro, e a espécie *Eucalyptus eremophila* apresentou a maior taxa de 1,8-cineol, sendo que os conteúdos das diferentes amostras variam de acordo com a espécie e com a colheita (ELAISSI *et al.*, 2007).

O rendimento e as proporções entre os componentes de um óleo essencial podem variar devido a diversos fatores como o clima, o ambiente, a estação do ano, as condições geográficas, a época da colheita, as variações genéticas e a técnica do processo de extração segundo Frizzo (2001) e Mendes *et al.* (2008).

Frente a gama de publicações científicas sobre o óleo essencial do gênero *Eucalyptus* e suas espécies, encontram-se diferentes propriedades e aplicações que merecem destaque.

Em se tratando de bioatividades, cita-se a atividade antibacteriana e antiviral do óleo essencial do *E. globulus* (CERMELLI *et al.*, 2008); aplicação como composição indutora de sono para tratamento de doenças como a insônia, incluindo acetato de geranila do óleo de espécie de eucalipto (KARITA, 2007); propriedades antimicrobianas e atividades biológicas do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus tereticornis* Sm. contra a espécie de carrapato *Amblyomma variegatum* (ALITONOU *et al.*, 2004).

Utiliza-se também eucalipto na medicina estética, como composição efetiva para supressão de armazenamento lipídico e para tratamento de obesidade, contendo óleos selecionados de *Eucalyptus* (SAKAI *et al.*, 2006).

Na odontologia, utilizam-se óleos essenciais de eucalipto e hortelã para uso como desodorizante bucal refrescante (ZHU, 2008), ou em composição contendo óleo essencial de *E. citriodora* e outros óleos para supressão de halitose e prevenção ou redução de doenças relacionadas à gengiva (TSUNODA, OSHIMA, MAEDA, 2007).

Para aplicação no sistema imune, observa-se efeito estimulador do óleo essencial de *Eucalyptus* na resposta imune mediada por células inatas (SERAFINO *et al.*, 2008), e na atividade fagocítica evidenciada *in vitro* e *in vivo* de macrófagos/granulócitos (SERAFINO *et al.*, 2006).

Encontram-se também aplicações na medicina alternativa, como um óleo essencial aromático para revigoração do corpo e da mente, para uso em ioga, incluindo alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), limão (*Citrus* sp.), bergamota (*Citrus reticulata*), patchouli (*Pogostemon patchouli* Pellet.) e *E. globulus* (CHU, 2008). Uma composição antistress, rapidamente efetiva em combater crises de tensão aguda, contém óleos essenciais de hortelã (*Mentha* sp.), rosa (*Rosa* sp.) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.) (MARIN, SONIE, 2005). Produtos de aromaterapia contendo óleos essenciais de eucalipto, hortelã, e alecrim, ou extratos destes, podem reduzir o desejo de nicotina e da sensação acompanhada de fumar (KITAGAWA, 2005).

Em formas farmacêuticas, encontra-se um emulsificante anti-parasita usado na forma de xampu e sabão, o qual concentra óleo essencial de *E. globulus*, cujo ativo base é o monoterpeneo 1,8-cineol, efetivo contra ecto e endoparasitas em animais (DE SOUZA CHAGAS *et al.*, 2004a). O mesmo uso aplica-se para *E. citriodora*, com princípio ativo: citronelal (DE SOUZA CHAGAS *et al.*, 2004b).

As aplicações na agricultura e na ecologia são numerosas, merecendo destaque um inseticida contendo óleo essencial de *Eucalyptus citriodorata* e o composto citronelal (BUKUSNE *et al.*, 2005); composição contendo óleos essenciais ou seus componentes de *Eucalyptus*, para aplicação em frutas protegendo-as contra fungos patogênicos que causam deterioração pós-colheita (KVITNITSKY *et al.*, 2006); ação inibitória do óleo essencial de folhas de *E. citriodora* em decomposição no controle de ervas daninhas, com bom valor comercial (BATISH *et al.*, 2006); fungicida natural incluindo uma dispersão do óleo essencial de *Eucalyptus sp.*, útil para tratamento de cultivo orgânico e biodinâmico, reduzindo o uso de agroquímicos nos cultivos convencionais (TESSMANN, 2007); efeitos larvicidas do óleo essencial de *Eucalyptus grandis* e da resina do pinho (turpentina) sobre larvas de *Aedes aegypti*, contribuindo à pesquisa por novos larvicidas biodegradáveis de origem natural (LUCIA *et al.*, 2007); e emulsão em forma de *spray*, baseada no óleo essencial de *Eucalyptus citrioca*, aplicada em plantas como repelente de insetos (*Bemista tabaci*) (LEITE DENADAI *et al.*, 2008);

Em estudo farmacológico, foram observadas propriedades antinociceptivas em roedores, com o 1,8-cineol e o  $\beta$ -pineno, componentes do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus camaldulensis*, comparados com o efeito da morfina e naloxone (LIAPI *et al.*, 2007). Os efeitos relaxantes do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* e de seu principal constituinte, 1,8-cineol, foram visualizados na musculatura lisa traqueal do “guinea-pig” segundo Coelho-de-Souza *et al.* (2005).

As substâncias químicas *p*-menth-5-en-2-ona e *p*-menth-6-en-3-ona foram encontradas pela primeira vez na natureza e caracterizadas como constituintes minoritários do óleo essencial de *Eucalyptus dives* (WEBER *et al.*, 2006).

Inúmeros são os estudos que demonstram a atividade antimicrobiana de óleos aromáticos de folhas de *Eucalyptus* (SARTORELLI *et al.*, 2007; GILLES *et al.*, 2010; TYAGI e MALIK, 2011), enquanto somente poucos trabalhos investigam o

emprego de óleos essenciais de outros órgãos vegetativos como frutos e flores (GIAMAKIS *et al.*, 2001; MULYANINGSIH *et al.*, 2010). Pesquisas envolvendo a atividade contra microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos também são escassas (GILLES *et al.*, 2010).

O óleo essencial de eucalipto foi considerado seguro e não-tóxico pela FDA (Food and Drug Administration of the USA). Na Europa, também foi aprovado o uso de essências de eucalipto como aromatizantes em alimentos (BATISH *et al.*, 2008). Os extratos de folhas de *Eucalyptus* são aprovados como aditivos alimentares (TAKAHASHI, KOKUBO, SAKAINO, 2004). No Japão, o extrato de folhas de eucalipto está na Lista de Aditivos Alimentares como antioxidante (AMAKURA *et al.*, 2002).

Além de compostos voláteis do óleo essencial, encontram-se também compostos flavônicos, taninos, dentre outros compostos fenólicos presentes em extratos entre as várias espécies de *Eucalyptus* (COSTA, 1986).

É de grande interesse aprofundar as informações sobre os fenóis totais, em especial flavonoides e taninos, os quais apresentam grande potencial terapêutico.

### 3.3 FENÓIS TOTAIS

Os fenóis ou compostos fenólicos são constituintes químicos caracterizados por possuir pelo menos um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, podendo ser compostos simples e complexos. Abrangem o maior grupo de metabólitos bioativos no reino vegetal. Alguns compostos fenólicos são amplamente utilizados industrialmente na fabricação de resinas, corantes e explosivos, como matéria-prima na indústria farmacêutica, como reveladores fotográficos na indústria de tintas, e na indústria de alimentos como flavorizantes, aromatizantes e antioxidantes (SIMÕES *et al.*, 2003).

#### 3.3.1 Flavonoides

Os flavonoides podem ser encontrados em várias formas estruturais, a maioria dos representantes desse grupo possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído por  $C_6 - C_3 - C_6$ , em que duas fenilas são ligadas

por uma cadeia de três carbonos entre elas. Nesta estrutura básica, as unidades são chamadas núcleos A, B e C (Figura 01). Apresentam-se na forma livre ou na forma de glicosídeos, além de representar um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (ZUANAZZI, 2003).

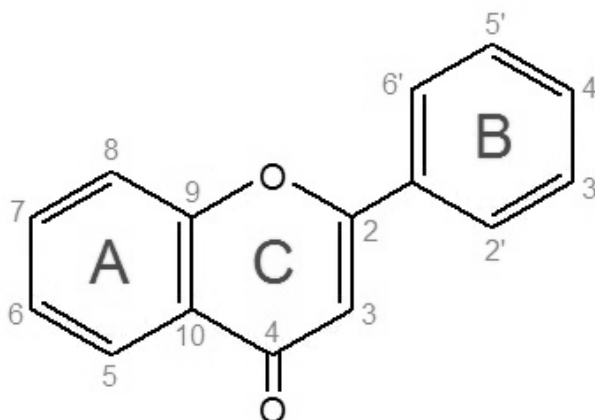


FIGURA 01 – NÚCLEO FUNDAMENTAL DE FLAVONOIDES.

As principais classes de flavonoides são representadas pelas flavonas, flavonóis, antocianos, chalconas, auroras, di-hidroflavonoides, flavanas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas, neoflavonoides, biflavonoides (ZUANAZZI, 2003).

São considerados importantes marcadores quimiotaxonômicos, por serem compostos amplamente distribuídos, com ampla diversidade estrutural, muito estáveis e facilmente detectáveis. O valor diagnóstico destes compostos como marcadores entre espécies, foi durante muitos anos, sua característica mais reconhecida e a maioria das investigações centravam-se apenas em seu isolamento e identificação. Os pesquisadores Prof. T.J. Mabry (Universidade do Texas, EUA) e o Prof. Dr. J. Harborne (Universidade de Reading, Reino Unido) foram os que mais contribuíram para o conhecimento dos flavonoides quanto a sua química e distribuição quimiosistemática (MUSCHIETTI, MARTINO, 2009).

Algumas funções são atribuídas aos flavonoides nos vegetais, como a proteção das plantas contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos; a atração de animais para facilitar a polinização; controle da ação de hormônios vegetais; inibidores de enzimas; agentes alelopáticos; e



antioxidantes. Uma planta pode apresentar diferentes classes de flavonoides em diferentes órgãos vegetais, e em diferentes concentrações (ZUANAZZI, 2003).

O interesse na atividade biológica dos flavonoides iniciou em meados de 1949. Como consequência do ressurgimento no interesse na Medicina Tradicional, teve lugar nos últimos anos, a maior ênfase no estudo das bioatividades destes compostos, e uma necessidade de entender a interação que estes compostos fenólicos apresentam com as células. Já faz tempo que se conhecem as atividades: anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombica, antiviral e anticarcinogênica destes em situações experimentais. Por sua natureza fenólica, atuam como potentes quelantes e captadores de radicais livres. Apesar de serem numerosas as atividades biológicas informadas na bibliografia, existem três atividades principais pelas quais os flavonoides são bem reconhecidos: (1) atividade antioxidante, (2) atividade anti-proliferativa, (3) atividade anti-inflamatória (MUSCHIETTI, MARTINO, 2009).

Os flavonoides também foram encontrados em espécies de *Eucalyptus*, relatando a sua presença principalmente nas folhas e cascas. Santos e Waterman (2001a) relataram o isolamento de quatro flavonoides glicosídeos, a partir das folhas de *E. ovata* Labill..

### 3.3.2 Taninos

Os taninos são constituintes fenólicos como peso molecular de 500 a 3000 Dalton, que geralmente formam complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas. Estes compostos possuem importância pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fator de controle de insetos, fungos e bactérias, assim como para seus principais usos industriais, como na manufatura do couro (SANTOS, MELLO, 2003).

Os taninos são classificados em dois grandes grupos: os hidrolisáveis e os condensados (Figura 02). Os taninos hidrolisáveis são normalmente compostos que contêm uma parte central de glicose ou outro álcool esterificado polihídrico, com ácido gálico (galotaninos) ou ácido hexahidroxidifênico (elagitaninos). Os taninos condensados são principalmente flavolans ou polímeros de flavan-3-óis (catequinas) e/ou flavan-3,4-dióis (leucoantocianidinas) (COWAN, 1999).

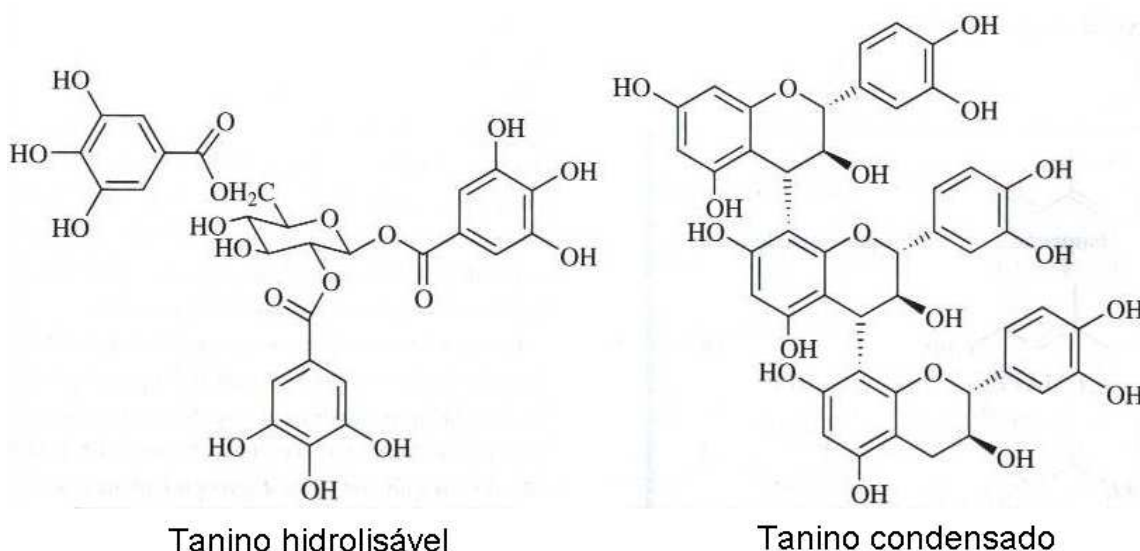


FIGURA 02 - ESTRUTURA DOS DOIS PRINCIPAIS TIPOS DE TANINOS.

Acredita-se que as atividades biológicas dos taninos estão ligadas a algumas características gerais que são comuns aos dois grupos de taninos, como: a sua capacidade de complexação com íons metálicos, e com macromoléculas (proteínas e polissacarídeos); sua atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres. Assim, são relatadas várias atividades desses compostos, possuindo efeito hemostático nas hemorragias, cicatrizante e protetor em feridas externas, antídoto em casos de intoxicações, antidiarréico, antisséptico, antimicrobiano, entre outros (SANTOS, MELLO, 2003).

O emprego dos taninos, além do curtimento de couro e tingimento de tecidos, esses compostos possuem outras aplicações industriais. Os taninos condensados são capazes de reagir com o formaldeído produzindo polímeros com poder aglutinante, sendo utilizados para reduzir o fluxo de água em barragens, na produção de borrachas e na fabricação de resinas de troca catiônica. Os taninos também contribuem significativamente no sabor adstringente e aparência de vinhos, sucos de frutas, chás e outras bebidas (SANTOS, MELLO, 2003).

A ocorrência de taninos no gênero *Eucalyptus* é apreciada, em que a partir das folhas das espécies *E. consideriana* Maiden e *E. viminalis* Labill. foram isolados taninos hidrolisáveis (SANTOS, WATERMAN, 2001b).

### 3.4 *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex BENTH.

*Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Figura 03), importante espécie originária da Austrália (TROPICOS, 2011), por apresentar produtividade de óleo essencial relativamente superior ao das demais espécies do gênero. É utilizada para fins ornamentais por apresentar rápido crescimento e resistência ao ataque de parasitas aliadas ao formato de suas folhas (MOREIRA *et al.*, 1980).

Popularmente é conhecido como “silver dollar tree”, “silver dollar gum”, “argyle apple” e também, como eucalipto prateado. Os nomes populares referem-se à prata e as folhas arredondadas (Figura 04), que são verdes levemente prateadas, lembrando uma moeda de prata. As folhas jovens apresentam esta coloração mais evidente, sendo muito utilizada em arranjos florais (WIRTHENSOHN, SEDGLEY, 1998; CAMPBELL, OGLE, JOYCE, 2000).

São árvores de pequeno a médio porte quando comparadas a outras espécies do gênero, como por exemplo, *E. globulus* que atinge 70 metros de altura, segundo Corrêa (1984). De acordo com a descrição de Mangieri e Dimitri (1958) são formadas de eixo vertical com altura até 20 metros; as folhas são ovaladas, cordiformes na base, sésseis, opostas, apresentam fragrância característica (Figura 04); as flores são de coloração branca a amarelo claro, são subsésseis ou ligeiramente pediceladas, estão dispostas em umbelas axilares triflorais, tendo como base um pedúnculo suavemente comprido (Figuras 05 e 06); os frutos são secos e capsular, medem 8 mm de diâmetro, possuindo 3-4 valvas triangulares (Figura 07); as sementes são escuras e rugosas. Esta espécie cresce naturalmente em qualquer tipo de solo, em ambientes úmidos, muito embora tolere a falta de umidade, e é cultivada no estado do Paraná – Brasil com adequada aclimação (MOREIRA *et al.*, 1980).

Rumyantseva (1958) considera a espécie *E. cinerea* tão valiosa quanto a *E. globulus* em relação à produção de 1,8-cineol, sendo mais resistente ao tempo frio que a última. Merece destaque o conteúdo de 1,8-cineol que excedeu 80% em *E. cinerea*, investigada entre nove espécies de eucalipto com origem em Marrocos, a composição química das folhas dos óleos essenciais (ZRIRA *et al.*, 2004).

Moreira *et al.* (1980) verificaram a concentração de óleo essencial das folhas de *E. cinerea* durante o período de um ano e determinaram que a concentração do

óleo essencial nos meses de junho a dezembro apresentou rendimento médio de 7,92%, e pela análise físico-química, determinaram os principais componentes deste óleo e sua respectiva concentração: 1,8-cineol (65%),  $\alpha$ -pineno (5,41%),  $\beta$ -pineno (3,42%), diterpeno (3,40%), limoneno (2,75%),  $\alpha$ -terpinol (2,18%),  $\alpha$ -terpineno (0,71%). O que pouco difere nos estudos realizados por Franco *et al.* (2005) em que os principais componentes identificados no óleo essencial das folhas de *E. cinerea* por CG/EM foram: 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno, limoneno e  $\alpha$ -terpineol. Tendo como bioatividade a avaliação antimicrobiana pelo método de difusão em disco, que indicou qualitativamente o potencial antimicrobiano do óleo essencial da espécie em questão frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura.



FIGURA 03 – *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex BENTH., ASPECTO DA ÁRVORE EM SEU HÁBITAT.  
FONTE: O autor (2009)



FIGURA 04 – FOLHAS DE *E. cinerea*.  
FONTE: O autor (2009)



FIGURA 05 – INFLORESCÊNCIA DE *E. cinerea*.  
FONTE: O autor (2009)





FIGURA 06 – BOTÕES FLORAIS DE *E. cinerea*.  
FONTE: O autor (2009)



FIGURA 07 – FRUTOS DE *E. cinerea*.  
FONTE: O autor (2009)

### 3.4.1 Enquadramento taxonômico

A Tabela 01 mostra o enquadramento taxonômico da espécie em estudo, considerando os sistemas de classificação propostos por Engler (1964) e por Cronquist (1981).

TABELA 01 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Eucalyptus cinerea* F. MUELL. ex BENTH., SEGUNDO ENGLER (1964) E CRONQUIST (1981).

Táxon	Engler (1964)	Cronquist (1981)
Reino	Plantae	Plantae
Divisão ou Filo	Embryophyta siphonogama	Magnoliophyta
Subdivisão	Angiospermae	-
Classe	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Subclasse	Archychlamydeae	Rosidae
Ordem	Myrtiflorae	Myrtales
Subordem	Myrtineae	-
Família	Myrtaceae Juss.	Myrtaceae Juss.
Gênero	<i>Eucalyptus</i> L'Hér.	<i>Eucalyptus</i> L'Hér.
Espécie	<i>Eucalyptus cinerea</i> F. Muell. ex Benth.	<i>Eucalyptus cinerea</i> F. Muell. ex Benth.

A Tabela 02 apresenta o novo sistema de classificação APG II, sucessor do Sistema APG de 1998, é um dos mais modernos sistemas para a classificação das angiospermas (segundo critérios filogenéticos), publicado em 2003 por um grupo de pesquisadores que se autodenominou "APG II" (do inglês *Angiosperm Phylogeny Group*, Grupo de Filogenia das Angiospermas). Este sistema ainda está em pleno desenvolvimento e evolução, sendo revisado constantemente.

TABELA 02 – SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DA ESPÉCIE EM ESTUDO SEGUNDO APG II.

Clado	APG II (2003)
Núcleo	Eudicotiledôneas
Clado	Rosídeas
Ordem	Myrtales
Família	Myrtaceae Juss.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BOTÂNICO

O material vegetal da espécie *E. cinerea* F. Muell. ex Benth. foi coletado de planta adulta (cerca de 5 kg), localizado no Centro Politécnico, Campus da Universidade Federal do Paraná – UFPR, em Curitiba, Paraná, Brasil (latitude 25° 27' S, longitude 49° 13' O e altitude de 922 m), no período de 2009-2010. A identificação da exsicata encontra-se sob o número de registro 47863, depositada no Herbário do Departamento de Botânica (UPCB), do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Foram efetuadas coletas sazonais das partes aéreas das folhas, flores e frutos, para avaliar se há variação da composição de metabólitos do material durante as diferentes estações do ano e entre os diferentes órgãos vegetais. As coletas foram realizadas sempre no mesmo horário no período da manhã. Nas coletas executadas foi observado que na estação da primavera houve ausência de flores, enquanto que no verão ocorreu a presença somente de folhas. Portanto, a floração ocorre no outono e inverno e a frutificação ocorre no outono, inverno e primavera.

O material coletado das folhas foi dividido em duas amostras, uma mantida à temperatura ambiente para o processo de secagem, e outra utilizada fresca, recém-coletada. As flores e os frutos foram utilizados secos após quinze dias de secagem.

### 4.2 MORFOANATOMIA

A análise morfoanatômica foi desenvolvida no Laboratório de Microtécnica Vegetal, do Departamento de Botânica, e no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, no Centro de Microscopia Eletrônica (CME), ambos da UFPR.

#### 4.2.1 Preparo do material

Foram coletadas amostras de folhas de *E. cinerea*, para a obtenção das medidas referentes ao comprimento e largura do limbo foliar. Foram mensuradas dez folhas e obtida a média. Folhas foram destacadas a partir do quinto nó, do ápice em direção à base do ramo, para análise morfoanatômica. Com o auxílio de uma lâmina cortante, à mão livre, foram realizadas diferentes secções nas folhas - da



porção mediana, da extremidade do limbo e da nervura mediana. O material em questão foi fixado em FAA 70 durante sete dias (JOHANSEN, 1940), e posteriormente armazenado em álcool etílico a 70% (BERLYN, MIKSCH, 1976).

A descrição da morfologia externa da folha foi baseada em Hickey (1974).

#### **4.2.2 Clarificação das folhas**

É uma técnica de tornar semitransparentes peças vegetais de tamanhos variados, geralmente laminares, denominada de clarificação ou diafanização. Basicamente consiste na dissolução do conteúdo celular, restando apenas a parede celular, o que se presta eficientemente para o estudo da nervação foliar.

O reagente empregado para clarificação foi uma solução aquosa de hipoclorito de sódio a 20%. Após sete a dez dias ao observar as folhas semitransparentes, foram lavadas com água destilada e coradas com safranina a 0,25%. Para comprovar a classificação da venação das folhas utilizou-se os critérios propostos nos estudos de Hickey (1974).

#### **4.2.3 Preparo de lâminas semipermanentes**

Para o preparo das lâminas semipermanentes foram realizados cortes à mão livre, das secções transversais da porção mediana do limbo foliar, bem como das secções paradérmicas das faces adaxial e abaxial das folhas da espécie em estudo. Para a coloração das secções foram empregados azul de astra e fucsina básica (BRITO, ALQUINI, 1996); a montagem das lâminas foi realizada com glicerina a 50% e a lutagem com esmalte incolor.

#### **4.2.4 Preparo de lâminas permanentes**

As lâminas permanentes foram confeccionadas a partir do material fixado em FAA 70. A desidratação foi realizada em série etanólica crescente (80% e 95%) com intervalo de duas horas em cada concentração. Na pré-infiltração usou-se álcool etílico a 95% e resina, a vácuo. O material foi infiltrado, por quatro dias, em glicol-metacrilato (Leica Historesin<sup>®</sup>). Após emblocamento, cortes finos foram obtidos em micrótomo de rotação (Olympus CUT 4055). A coloração foi efetuada com azul de toluidina e a montagem das lâminas em resina (Permunt<sup>®</sup>) (KRAUS, ARDUIN, 1997).

#### 4.2.5 Testes microquímicos

Os reativos utilizados para os testes microquímicos, depois de realizadas as secções transversais do material à mão livre, foram: cloreto férrico, para a comprovação de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940); floroglucina clorídrica, para evidenciar a presença de lignina (FOSTER, 1949); Sudan III, para investigar substâncias graxas, gotículas de óleo, cutina e suberina (SASS, 1951); lugol, indicado para comprovação de amido (BERLYN, MIKSCHE, 1976); e ácido sulfúrico, para cristais (OLIVEIRA, AKISUE, 1987).

#### 4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise ultraestrutural de superfície em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi realizada segundo Souza (2007). As amostras fixadas passaram por desidratação etanólica crescente (80%, 90% e 100%), mantidas por 10 min em cada concentração. As amostras desidratadas foram inseridas em um suporte e colocadas em aparelho de ponto crítico (Bal-Tec CPD-030). Em seguida, foram aderidas com uma fita de cobre em suporte apropriado, metalizadas com ouro em aparelho (Bal-Tec SCD-030), observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6360LV).

Para preservar a organização da cera epicuticular, seguiu-se a metodologia estabelecida por Brito e Alquini (1996) com algumas modificações. Nesta análise, algumas amostras de folhas foram separadas, as quais foram apenas secas em dessecador para em seguida serem levadas diretamente ao ponto crítico e metalizadas em ouro. Posteriormente o material foi encaminhado para análise em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6360LV), observado e fotografado.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DE ÁGUA

O método selecionado para avaliar a determinação de água nas folhas frescas de *E. cinerea* foi o ensaio gravimétrico de perda por dessecação, segundo Farmacopeia Brasileira (2000) com adaptações. Para a realização desse procedimento, uma massa conhecida de aproximadamente 5 g do material cortado, não excedendo 3 mm para cada lado, foi colocada a amostra em estufa a 105 °C durante 5 horas para dessecar. A amostra foi resfriada à temperatura ambiente em dessecador, pesada e repetida a operação até que duas pesagens sucessivas não

indicaram uma diferença maior do que 5 mg. O ensaio foi efetuado em triplicata e para calcular a porcentagem de água utilizou-se a seguinte equação:

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \cdot 100$$

Onde:

$P_a$  = peso da amostra;

$P_u$  = peso da placa de petri contendo a amostra antes da dessecação;

$P_s$  = peso da placa de petri contendo a amostra após a dessecação.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais da espécie *E. cinerea* foram obtidos das flores, frutos, folhas frescas e secas, das quatro coletas (outono, inverno, primavera, verão) por meio de hidrodestilação, com aparelho tipo Clevenger (FARMACOPEIA Brasileira, 1988; SIMÕES *et al.*, 2003), conforme ilustra Figura 08, utilizando cerca de 200 g de cada material fragmentado em 2 L de água destilada, por um período de 6 horas.

O rendimento de cada óleo essencial - total de 13 amostras - foi determinado em porcentagem de volume (mL) de óleo essencial por massa (g) de material vegetal (% v/m) (FARMACOPEIA Brasileira, 1988).

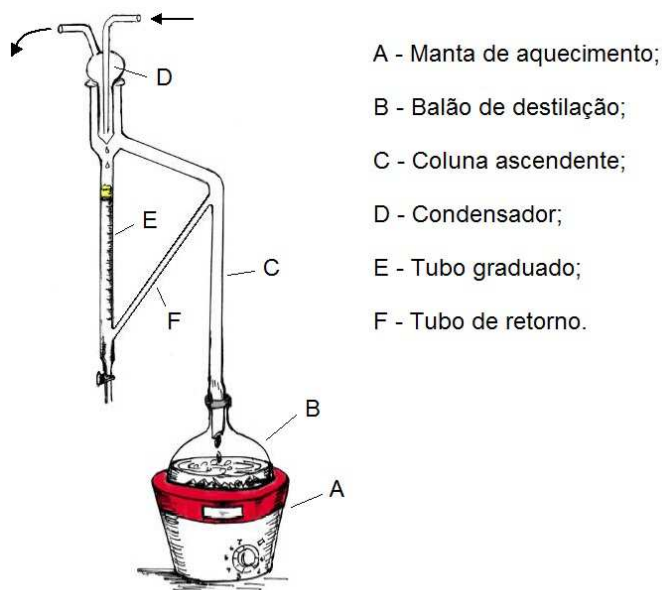


FIGURA 08 – APARELHO DE CLEVINGER.

## 4.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A partir dos óleos essenciais, foram realizadas as análises dos seguintes parâmetros físico-químicos: densidade relativa, índice de refração, poder rotatório e solubilidade em etanol, para garantir o controle de qualidade desses óleos voláteis.

### 4.5.1 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa ( $d_{20}^{20}$ ) foi determinada através do método do picnômetro com 1 mL de capacidade (FARMACOPEIA Brasileira, 1988). Considerou-se a massa da amostra líquida de óleo essencial e a massa da água purificada, ambas a mesma temperatura a 20 °C.

### 4.5.2 Determinação do índice de refração

Segundo a Farmacopeia Brasileira (1988), o índice de refração ( $n$ ) de uma substância é a relação entre a velocidade da luz no ar ou no vácuo e a velocidade da luz na substância. Esse ensaio foi efetuado em refratômetro ABBE modelo ausJENA. A temperatura permaneceu constante a 20 °C.

### 4.5.3 Determinação do poder rotatório

O poder rotatório ( $\alpha$ ) foi determinado através do polarímetro ADP 440<sup>+</sup>, à temperatura de 20 °C (FARMACOPEIA Brasileira, 1988).

### 4.5.4 Determinação da solubilidade em etanol

A solubilidade do óleo essencial foi determinada em etanol a 70%, 80%, 90% e em etanol absoluto (PHARMACOPOEA Helvetica, 1993). O etanol foi colocado em uma bureta de 25 mL, e gotejado sobre a amostra de 0,1 mL de óleo essencial. Após a solubilização total da amostra, foi realizada a leitura do volume gasto de etanol na bureta, estabelecendo-se a relação de solubilidade solvente/amostra (v/v).

## 4.6 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) serviu para identificar os constituintes voláteis presentes no óleo essencial (COLLINS, BRAGA, BONATO, 1997).

Foi usado um cromatógrafo gasoso marca Varian® modelo 3800, acoplado a um espectrômetro de massas marca Saturn® modelo 2000 com quadrupolo, equipado com uma coluna capilar CP-Sil 8 low bleeding (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A temperatura do injetor foi de 280 °C, sendo que a temperatura inicial foi de 60 °C, com rampa de aquecimento de 3 °C/min, elevando até temperatura final de 280 °C por 10 min. O gás de arraste foi o hélio, usado a uma pressão constante de 59 kPa e vazão constante de 1 mL/min. As amostras de óleo essencial foram diluídas na proporção 1 µL/mL de hexano.

As condições de EM foram: energia de impacto de 70 eV, velocidade de decomposição 1666 amu/s; intervalo de decomposição de 0,2 s; fragmentos de 40 Da a 350 Da decompostos.

Os compostos dos óleos essenciais foram identificados pela comparação com os dados da literatura (ADAMS, 2007) e com os espectros de massas da biblioteca NIST 2008 – banco de dados do sistema.

Para auxiliar a identificação dos compostos, foi realizado o cálculo do Índice de Kováts (IK) de cada componente, através da comparação do tempo de retenção da amostra em relação a padrões de *n*-alcanos, o que pode ser chamado de Índice de Retenção, proposto por Kováts em 1958 como um parâmetro para identificação de solutos em cromatogramas (SKOOG, 2002). O IK relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de *n*-alcanos. Tais índices permitem uma comparação melhor dos dados sendo calculados pela fórmula abaixo (CAZES, DEKKER, 2004).

#### **Fórmula para o cálculo dos Índices de Kováts**

$$IK_x = 100y + 100(z - y) \cdot \frac{t(r)_x - t(r)_y}{t(r)_z - t(r)_y}$$

Onde:

$y$  = n°. de carbonos do padrão à esquerda;

$z$  = n°. de carbonos do padrão à direita;

$t(r)x$  = tempo de retenção do composto considerado;

$t(r)y$  = tempo de retenção do padrão à esquerda;

$t(r)z$  = tempo de retenção do padrão à direita.

#### 4.7 OBTENÇÃO DE EXTRATOS ORGÂNICOS

A obtenção dos extratos orgânicos - total de 18 amostras - para a avaliação das atividades biológicas (antibacteriana e antifúngica) procedeu-se da seguinte maneira:

##### 4.7.1 Extração através de Soxhlet

Para a extração contínua realizada com o aparelho Soxhlet (Figura 09), usaram-se 100 g de cada órgão vegetal moído (folhas, frutos e botões florais) da coleta de inverno/2009, seguindo uma sequência de solventes com polaridade crescente: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila.



FIGURA 09 – APARELHO DE SOXHLET UTILIZADO PARA EXTRAÇÃO POR SEQUÊNCIA DE SOLVENTES COM POLARIDADE CRESCENTE.  
FONTE: O autor (2009)

Os extratos foram concentrados em rotaevaporador e calculados os respectivos rendimentos (g).

#### **4.7.2 Extração por refluxo**

A extração por refluxo foi realizada utilizando álcool absoluto, álcool 70% e álcool 50% até esgotamento total, na temperatura de 60 °C.

Os extratos foram concentrados em rotaevaporador e calculados os respectivos rendimentos (g).

### **4.8 ANÁLISE DAS FOLHAS, FLORES E FRUTOS DE *E. cinerea***

Foram realizados os ensaios fitoquímicos para a verificação preliminar da presença dos principais grupamentos químicos presentes nos extratos das folhas, flores e frutos de *E. cinerea*, baseando-se na metodologia de MOREIRA (1979), modificada segundo NAKASHIMA (1993).

#### **4.8.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20% (p/v)**

O extrato bruto foi obtido por maceração à temperatura ambiente. Em 40 g do órgão vegetal foi fragmentado e foi deixado imerso em 200 mL do líquido extrator, o etanol a 70% (v/v), em frasco âmbar devidamente fechado, durante um período de 10 dias. Após esse período o material foi filtrado e completado o seu volume até 200 mL. Uma alíquota foi separada para a determinação do teor de sólidos e determinações organolépticas: cor, odor, sabor e pH do extrato bruto. Em seguida, o extrato hidroalcoólico bruto foi transferido a um balão apropriado e concentrado em evaporador rotatório Quimis Q344 até que seu volume reduziu a aproximadamente um terço do original. Esse processo visa a retirada do excesso do solvente extrator, para diminuir a interferência deste no processo posterior de fracionamento.

##### **4.8.1.1 Obtenção das frações**

O extrato obtido foi submetido ao fracionamento por partição líquido/líquido em funil de separação, através da extração sequencial com solventes de polaridade crescente: *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila, usando 10 x 20 mL de cada solvente extrator. As frações obtidas, inclusive a hidroalcoólica remanescente, foram avaliadas através de uma triagem fitoquímica.

#### 4.8.1.2 Pesquisa de metabólitos secundários

O ensaio fitoquímico foi desenvolvido para as quatro frações (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente) provenientes do extrato hidroalcoólico bruto. Os grupos de metabólitos secundários foram pesquisados através de reações específicas para alcaloides, compostos flavônicos, cumarinas, antraquinonas, esteroides e/ou triterpenoides, glicosídeos saponínicos e taninos.

#### 4.8.2 Preparo do extrato aquoso a 20% (p/v)

Foi necessário 40 g de cada material vegetal fragmentado ficar imerso em 200 mL de água destilada. O preparo do extrato aquoso foi realizado através da maceração, a uma temperatura de 60 °C em banho-maria durante duas horas. Após, executou-se a filtração e o extrato final foi completado na proporção de 20%. Em seguida foram determinadas as características organolépticas: cor, odor, sabor e pH, e também a análise do teor de sólidos.

##### 4.8.2.1 Pesquisa de metabólitos secundários

Os metabólitos secundários presentes no extrato aquoso foram avaliados pelas reações de caracterização utilizadas para detectar: glicosídeos antociânicos, glicosídeos saponínicos, glicosídeos cianogênicos, taninos, aminogrupos, ácidos fixos e ácidos voláteis. Considerando a intensidade de cor e/ou o aparecimento de precipitado na realização das reações foram interpretadas como respostas aos ensaios qualitativos desenvolvidos.

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

Para a determinação de fenóis totais a metodologia foi baseada por WANG, LEE e PENG (1997), com modificações.

A técnica baseia-se na intensidade da cor azul formada pela redução do reagente Folin-Ciocalteu em presença de álcali – carbonato de sódio. A reação determina fenóis pela presença de hidroxilas fenólicas.

##### a) Preparo dos extratos

Uma amostra de 8 g de cada órgão vegetal moído (folhas, flores e frutos) foi extraída com acetona aquosa 80% por 1 hora, utilizando três vezes com porções de



30 mL do líquido extrator. A extração foi realizada sob agitação através do aparelho ultrassom (Ultra Cleaner 800A Unique). O volume final foi filtrado em papel de filtro e ajustado para 100 mL com acetona aquosa 80% em um balão volumétrico, originando a solução mãe (SM).

Segue o mesmo processo utilizando outro líquido extrator, etanol 100%.

O conteúdo de fenóis totais foi determinado a partir das soluções dos extratos acetônicos e etanólicos.

#### b) Determinação de Fenóis Totais

A solução mãe do extrato (50 µL) foi diluída com 2 mL de água destilada em um balão volumétrico de 10 mL; 1 mL do reagente fenol Folin-Ciocalteu foi adicionado e o balão foi agitado vigorosamente. Imediatamente, 5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 20% foram pipetados, e em seguida completou-se o volume de 10 mL do balão volumétrico com água destilada, agitando novamente. Devido à ocorrência de precipitação do carbonato de sódio na presença do solvente da solução mãe (acetona ou etanol), o balão foi colocado no aparelho ultrassom até completa homogeneização. Após 20 min, a absorvância da mistura foi lida a 735 nm usando um espectrofotômetro UV-Visible Shimadzu-1601. Os resultados foram plotados após a realização do mesmo procedimento com uma substância padrão o ácido gálico (50 a 300 µg/mL). A equação da curva analítica do ácido gálico foi  $y = 1209,2 x - 74,568$ , onde y é a concentração do ácido gálico, x é a absorvância e o coeficiente de correlação  $R = 0,9981$ . O conteúdo de fenóis totais foram expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico)/g de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.10 DOSEAMENTO

O doseamento de flavonoides totais e taninos totais das partes aéreas de *E. cinerea* (folhas, frutos e flores) foram executados conforme as metodologias descritas em farmacopeias e literaturas (GLASL, 1983; PHARMACOPOEA Helvetica, 1993; FARMACOPEIA Brasileira, 2003).

As análises foram feitas em triplicata e as leituras de absorvâncias realizadas no espectrofotômetro UV-Visible Shimadzu-1800, em 425 nm para flavonoides e 691 nm para taninos.

#### 4.10.1 Doseamento de flavonoides

No doseamento de flavonoides das amostras, foi utilizada a solução metanólica de cloreto de alumínio a 2% e a solução metanólica de ácido acético a 5% (PHARMACOPOEA Helvetica, 1993; FARMACOPEIA Brasileira, 2003); também foi traçada uma curva analítica com solução padrão de quercetina de diferentes concentrações (5 a 35 µg/mL), cuja equação foi  $y = 0,0254 x + 0,0239$  e o coeficiente de correlação  $R = 0,9985$ .

#### 4.10.2 Doseamento de taninos

No doseamento de taninos, utilizaram-se o reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2N, a solução aquosa de carbonato de sódio a 14,06% e o pó-de-pele, como agente proteico (GLASL, 1983; FARMACOPEIA Brasileira, 2003). A utilização do pó-de-pele, baseada na complexação/precipitação entre taninos e proteínas, determinou os polifenóis não adsorventes (PNA), sendo que a determinação do teor de taninos totais (TT) foi obtida pela diferença dos polifenóis totais (PT) e os não adsorventes (PNA).

### 4.11 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS QUÍMICOS

Para a continuidade ao experimento, as análises que seguem abaixo (item 4.11.1 ao 4.11.10) foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia – UEM com a colaboração do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

#### 4.11.1 Extrato bruto (EB)

As folhas secas de *E. cinerea* (600 g) foram moídas com o auxílio de um triturador, empregando-se o material sem separação granulométrica. Preparou-se o extrato bruto por turbo-extração levando a um turbolisador, durante 25 min utilizando

acetona/água (7:3; v/v) como líquido extrator, na proporção de 10% (m/v) (CORK, KROCKENBERGER, 1991). Após a filtração por algodão, o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório (Büchi R-114) na temperatura média de 40 °C até completa eliminação do solvente orgânico, sob pressão reduzida, congelado em N<sub>2</sub> líquido e liofilizado, rendendo 171,2357 g de extrato bruto (EB).

#### **4.11.2 Fração acetato de etila (FAE)**

Usaram-se 150 g do EB que foram ressuspensos em água destilada (1500 mL) e particionados com acetato de etila (10 x 150 mL) sob refrigeração (MELLO, PETEREIT, NAHRSTEDT, 1996). As fases acetato de etila foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, congeladas em N<sub>2</sub> líquido e liofilizadas, obtendo-se a fração acetato de etila (FAE) (56,5314 g). A fase aquosa restante também foi concentrada, congelada e liofilizada, obtendo-se a fração aquosa (FA) (50,8917 g).

Para posterior análise de RMN -<sup>13</sup>C no estado sólido foram separados 500 mg da fração semipurificada FAE, a fim de obter informações da estrutura e da dinâmica molecular dos compostos majoritários diretamente do material (folhas secas).

A FAE foi ainda separada para a realização de atividades biológicas (antioxidante e microbiológica).

#### **4.11.3 Cromatografia em coluna (CC)**

A FAE foi submetida à cromatografia em uma coluna de vidro (h: 700 mm, Ø: 55 mm) contendo SEPHADEX® LH-20 como fase estacionária. Após limpeza apropriada, a coluna foi estabilizada com etanol 50%. Foi adicionado cerca de 6 g de FAE no topo da coluna com auxílio de pipeta de Pasteur. Empregou-se a seguinte sequência de fase móvel:

1. Etanol 50% (1000 mL)
2. Etanol 100% (800 mL)
3. Metanol 50% (600 mL)
4. Metanol 100% (600 mL)
5. Acetona 70% (600 mL)

Obtiveram-se 5 frações: F1, F2, F3, F4, F5. O monitoramento foi realizado através de CCD (seção 4.11.4).

Recolheram-se as frações, as quais foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até eliminação total do solvente orgânico, congeladas em N<sub>2</sub> líquido e liofilizadas. Após a liofilização os rendimentos das frações foram: F1 (2,8871 g), F2 (0,4562 g), F3 (0,0284 g), F4 (0,1218 g) e F5 (0,3457 g).

#### 4.11.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Cromatografia em camada delgada (Figura 10) foi realizada em cromatofolhas de silicagel 60 F<sub>254</sub> (0,200 mm, Merck, Darmstadt, Germany) utilizando-se como sistema eluente, acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v). As substâncias foram visualizadas sob luz UV a 254 nm e após, revelação com FeCl<sub>3</sub> a 1% em etanol.

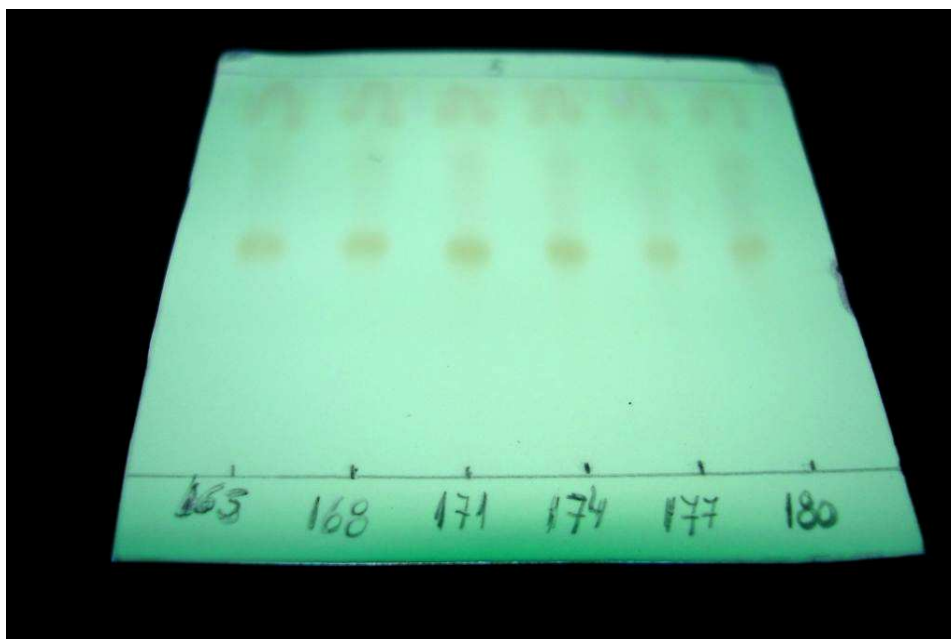


FIGURA 10 – CCD ASPECTO GERAL DAS FRAÇÕES 165 A 180 OBTIDAS NA CCCAV.

FONTE: O autor (2010)

#### 4.11.5 Partição da F1

A F1 foi escolhida devido seu perfil cromatográfico e por apresentar maior rendimento que as demais frações. Foi realizada a partição da F1 (usou-se 1 g) em funil de separação com 400 mL de *n*-hexano/água (1:1; v/v). A fase hexânica (F1-1) e a fase aquosa (F1-2) foram recolhidas separadamente, sendo que apenas a F1-2 foi concentrada em rotaevaporador, congelada em N<sub>2</sub> e liofilizada, obtendo-se a subfração F1-2 (0,5853 g).

#### 4.11.6 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV)

A subfração F1-2 (usou-se 0,4 g) foi submetida à CCCAV de acordo com Mello (1995) e Lopes *et al.* (2008). Utilizou-se um cromatógrafo em contra corrente de alta velocidade equipado com coluna de teflon de 130 m x 1,6 mm, capacidade de 285 ml e injetor de amostra com alça de 10 mL (CCCAV), com rotação média de 800 rpm e fluxo de 1 mL/min dado por bomba mod Waters 510. O sistema eluente empregado foi preparado em funil de separação com *n*-hexano:acetato de etila:metanol:água (1:5:1:5; v/v). A fase inferior foi utilizada como fase estacionária e a fase superior como fase móvel. Cada fração de 3 mL foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (Figura 10), o que totalizou 352 frações e os tubos foram reunidos por semelhança, totalizando 17 subfrações. Destas subfrações separaram-se as seguintes substâncias isoladas: F1-2#2, F1-2#10 e F1-2#14.

#### 4.11.7 Análise estrutural

A FAE foi analisada por <sup>13</sup>C MAS no estado sólido, com probe de sólidos CP-MAS de 7 mm e rotor de nitrito de silício de 7 mm com tampa Kel-F, em rotação de 5 kHz, pulso de 33,9° de 4,9 s e 1,0 s de intervalo entre as sequências de pulso (4168 repetições) em frequência de 75 MHz.

As substâncias isoladas foram analisadas através de métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e 2D (COSY <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H). Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho Varian, Mercury Plus 300BB de 300 MHz para <sup>1</sup>H e 75 MHz para <sup>13</sup>C, com o uso de solvente deuterado (CD<sub>3</sub>OD). Os espectros das substâncias foram analisados e comparados com dados constantes em literatura.

Apenas a substância F1-2#10 teve sua estrutura química elucidada, com continuidade nos ensaios complementares de identificação. Quanto à substância F1-2#2 ao receber os espectros de RMN para a identificação estrutural observou-se

impurezas. E a substância F1-2#14, sua interpretação dos espectros de RMN está sendo analisada.

#### 4.11.8 Rotação ótica (polarimetria)

A determinação ótica ( $[\alpha]_D^{20^\circ}$ ) da substância F1-2#10 sucedeu-se empregando metanol (grau HPLC) a 20 °C, em polarímetro Perkin Elmer 343, USA. Para a determinação do valor, empregou-se a seguinte equação:

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c}$$

onde:  $\alpha$  = rotação ótica obtida em graus a  $20 \pm 0,5$  °C

$l$  = comprimento da cubeta do polarímetro em cm

$c$  = concentração da substância em porcentagem (m/v)

#### 4.11.9 Espectroscopia de dicroísmo circular

A substância F1-2#10 foi solubilizada em metanol e medida em comprimento de onda entre 200-400 nm, empregando-se espectropolarímetro Jasco J-815, Japan. O cálculo da eliptizidade molar ( $[\theta_\lambda]$ ) foi realizado de acordo com a equação:

$$[\theta_\lambda] = \frac{\theta_\lambda}{C \cdot l} \cdot 100$$

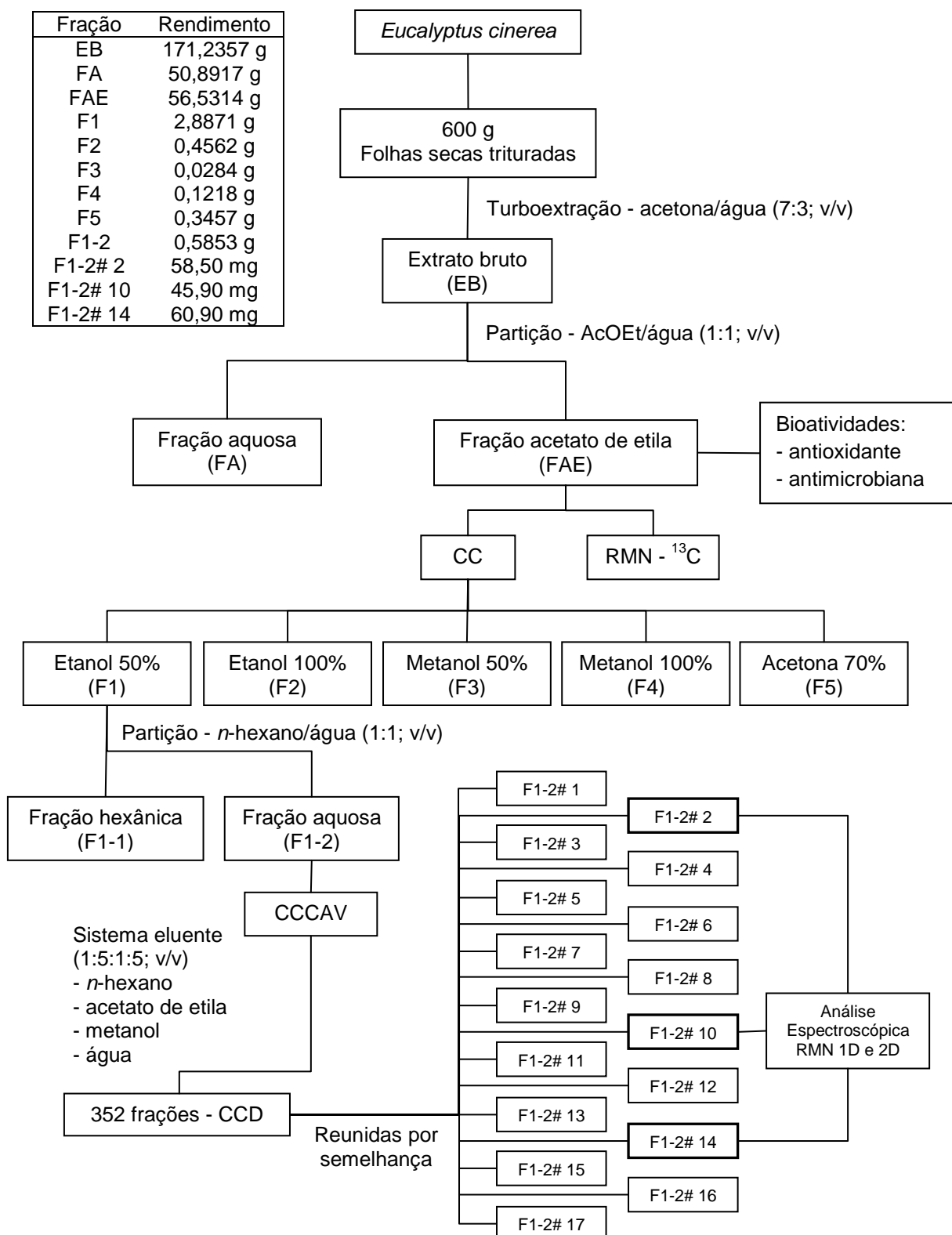
onde:  $[\theta_\lambda]$  = eliptizidade molar ( $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimol}^{-1}$ )

$\theta_\lambda$  = eliptizidade (deg)

$C$  = concentração molar ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$l$  = comprimento da cubeta (cm)

## 4.11.10 Fluxograma



#### 4.12 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Plantas com potencial antioxidante exercem papel fisiológico importante, tornando-se relevante a busca por antioxidantes naturais, entre os antioxidantes mais conhecidos estão as vitaminas, principalmente C e E, os flavonoides, entre os quais pode-se citar rutina, e taninos (ácido gálico) (SOARES, ANDREAZZA, SALVADOR, 2005).

Foram realizados dois métodos para avaliar a atividade antioxidante através do fosfomolibdênio e DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).

##### 4.12.1 Método fosfomolibdênio

O método de redução do complexo fosfomolibdênico para a determinação da capacidade antioxidante total (PRIETO, PINEDA, AGUILAR, 1999), é baseado na redução do molibdênio (Mo) VI a V pela amostra em análise. Essa redução possibilita a formação de um complexo verde fosfato/Mo (V) em pH ácido, determinado por espectrofotometria, em triplicata, a 695 nm.

Uma alíquota de 0,3 mL de cada amostra (extrato aquoso liofilizado – folhas, frutos e flores), em solução etanólica nas concentrações 100, 200, 300 e 400 µg/mL, foi acrescentada em tubos de ensaio 3 mL do reativo (molibdato de amônio 4 mmol.L<sup>-1</sup>, fosfato de sódio 28 mmol.L<sup>-1</sup>, ácido sulfúrico 0,6 mol.L<sup>-1</sup>). Os tubos foram fechados hermeticamente e levados ao banho-maria a 95 °C por 90 min.

Os tubos foram resfriados e a leitura foi efetuada em espectrofotômetro UV-Visible Shimadzu-1601 a 695 nm contra um branco (0,3 mL de etanol, acrescidos de 3 mL do reativo). Os padrões utilizados foram o ácido ascórbico e a rutina nas concentrações 100, 200, 300 e 400 µg/mL. Para efeitos de cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante, conforme a equação abaixo:

$$\% \text{ Ativ. Antioxidante} = \frac{\text{absorvância amostra} - \text{absorvância branco} \times 100}{\text{absorvância ác. ascórbico} - \text{absorvância branco}}$$

##### 4.12.2 Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)

O método é baseado segundo Blois (1958) modificado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), e na metodologia de Sousa *et al.* (2007) com adaptações, utilizando o radical estável DPPH<sup>•</sup> que sofre redução pelos antioxidantes com



mudança de coloração violeta para amarela proporcional à concentração do composto redutor da amostra.

#### a) Preparação dos extratos

Pesaram-se 20 g de cada material vegetal (folhas, flores e frutos) seco e moído. O extrato foi preparado por maceração com 50 mL de etanol à temperatura ambiente e protegido da luz, executou-se por quatro vezes consecutivas e cada extração com duração de 4 dias. Após o período de 16 dias de contato entre o órgão vegetal e o solvente, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo e em seguida foi diluído em metanol para ser utilizado na atividade antioxidante.

#### b) Atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante do extrato foi realizada em triplicata para cada amostra testada utilizando o radical livre DPPH<sup>•</sup> conforme metodologia descrita por Sousa *et al.* (2007), com modificações.

Inicialmente, foram preparados 50 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram realizadas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL. Para a construção da curva analítica foram realizadas as leituras das absorvâncias a 515 nm de todas as soluções (1 a 40 µg/mL), usando espectrofotômetro UV-Visible Shimadzu 1601. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata e em intervalos de 1 min entre cada leitura.

Foram preparadas soluções com metanol do extrato etanólico das folhas, flores e frutos de *E. cinerea*, da fração semipurificada FAE, e dos controles positivos: rutina (Merck) e ácido gálico (Merck) nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL. Para o ensaio, foram utilizados 2,7 mL de DPPH 40 µg/mL e 0,3 mL da amostra a ser testada. As medidas das absorvâncias foram feitas a 515 nm, no 1<sup>o</sup>., 5<sup>o</sup>. e 10<sup>o</sup>. min, a cada 10 min até completar 1 hora. A mistura de metanol (2,7 mL) e solução metanólica do extrato (0,3 mL) foi utilizada como branco.

Foram determinados a partir da equação da curva analítica e dos valores de absorvância no tempo de 30 min para cada concentração testada, os percentuais de DPPH remanescentes (%DPPH<sub>REM</sub>) utilizando a equação:

$$\%DPPH_{REM} = \frac{[DPPH]_{T=t}}{[DPPH]_{T=0}} \times 100$$

onde  $[DPPH]_{T=t}$  corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com o extrato, e  $[DPPH]_{T=0}$  é a concentração inicial de DPPH (40 µg/mL).

A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% – concentração eficiente 50 – (CE<sub>50</sub>) foi determinada a partir de uma curva linear de 1º. grau, plotando-se na abscissa as concentrações da amostra (µg/mL) e na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescente (%DPPH<sub>REM</sub>).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi obtida com os valores de absorvância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, utilizando a equação:

$$\%AA = \frac{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})]}{Abs_{controle}} \times 100$$

onde Abs<sub>controle</sub> é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH e Abs<sub>amostra</sub> é a absorvância da mistura de DPPH + amostra, no tempo de 30 min, e Abs<sub>branco</sub> corresponde a absorvância do branco (metanol + solução metanólica da amostra).

#### 4.13 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na avaliação da atividade antimicrobiana realizada com os óleos essenciais, com os extratos e com a fração semipurificada FAE, foi efetuada por dois métodos: a) por difusão em disco, b) microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Foram utilizadas as seguintes cepas de microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 902, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231 da marca NEWPROV®, sendo estas reconstituídas de acordo com a indicação do fornecedor.

As culturas microbianas foram padronizadas em  $10^8$  UFC/mL, estimadas por comparação ao tubo 0,5 da escala de McFarland, sendo posteriormente inoculadas em meios de cultura para avaliação da atividade antimicrobiana.

#### **4.13.1 Método de difusão em disco**

A atividade antimicrobiana de cada amostra foi avaliada pelo método de difusão em disco em meio sólido (RIOS, RECIO, VILLAR, 1988; KONEMAN *et al.*, 2001). Nesta técnica, realizada em cabine de segurança biológica Classe II, as suspensões microbianas de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* foram preparadas em soro fisiológico 0,9% e padronizadas de acordo com a escala de McFarland. Com auxílio de um swab estéril as suspensões microbianas foram semeadas em duplicata, em placas contendo Ágar Mueller-Hinton para bactérias e placas contendo Ágar Sabouraud Dextrose para leveduras. Os discos estéreis de papel de filtro com 6 mm de diâmetro foram impregnados com 10 µL das amostras e colocados sobre o material semeado.

As amostras de óleos essenciais foram testadas em 100% de óleo puro, e em diluições de 75%, 50% e 25% em Tween 80 a 10%. Como controles positivos foram utilizados o antibiótico cloranfenicol 30 µg e o antifúngico cetoconazol 50 µg, e como controle negativo Tween 80 a 10%. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas para bactérias e 25 °C por 48 horas para *C. albicans*.

As amostras de extratos orgânicos e da FAE foram testadas em concentrações de 100 mg/mL, 75 mg/mL, 50 mg/mL e 25 mg/mL sendo diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO). Como controle positivo foi utilizado cloranfenicol 30 µg e cetoconazol 50 µg, e como controle negativo DMSO. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 horas para bactérias e 25 °C por 48 horas para levedura.

Após o período de incubações, respeitadas as condições específicas para cada microrganismo, as zonas dos halos de inibição foram medidas (em mm) ao redor de cada disco e foi realizada a média dos resultados.

#### **4.13.2 Método de microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

A CIM foi determinada de acordo com alguns métodos com modificações (CHÉRAIF *et al.*, 2007; AYRES *et al.*, 2008; HANAMANTHAGOUDA *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais que apresentaram atividade antimicrobiana para a maioria das cepas microbianas e halos de inibição superiores a 8 mm foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo, para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (AYRES *et al.*, 2008).

Para os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, a CIM foi realizada usando caldo Mueller-Hinton, enquanto que para *Streptococcus pyogenes* utilizou-se o caldo Tripticaseína de Soja, e para a levedura *Candida albicans* o caldo Sabouraud Dextrose. O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços com fundo chato. Um volume de 100 µL dos diversos óleos essenciais, preparados na concentração de 100 mg/mL, diluídos em Tween 80 a 10%, foram inoculados nos orifícios. Em todos os orifícios foram adicionados 100 µL do caldo específico para cada microrganismo com auxílio de uma micropipeta de multicanal. Em seguida, uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício foi transferido para os orifícios da sequência e, após homogeneização, o mesmo volume foi transferido, repetindo-se este procedimento, obtendo-se assim as diluições seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 nas seguintes concentrações decrescentes dos óleos essenciais: 50 mg/mL; 25 mg/mL; 12,50 mg/mL; 6,25 mg/mL; 3,12 mg/mL; 1,56 mg/mL; 0,78 mg/mL; 0,39 mg/mL. Os inóculos microbianos na concentração de 0,5 de McFarland ( $10^8$  UFC/mL) foram diluídos 1:10 em solução salina estéril (0,9%), e desta diluição um volume de 10 µL foi depositado em todos os orifícios. Para o controle negativo, foi utilizado o diluente Tween 80 a 10%, e para o controle positivo o antibiótico cloranfenicol na concentração de 30 µg/mL e o antifúngico cetoconazol 50 µg/mL, realizando-se a diluição seriada. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 horas para as bactérias e 25 °C por 48 horas para *C. albicans*. Decorrido este intervalo de tempo foi acrescido em cada orifício 20 µL de uma solução aquosa do revelador TTC (cloreto de trifênil tetrazólio) a 0,5%, e as microplacas foram novamente incubadas por mais uma hora a 35 °C. A presença de uma coloração róseo-avermelhada foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do óleo essencial, enquanto que a transparência foi considerada prova positiva da ação inibitória do óleo. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo essencial em mg/mL capaz de impedir o crescimento microbiano (ou seja o aparecimento da coloração rósea). Cada teste foi realizado em triplicata.

O mesmo procedimento acima foi realizado com as amostras dos extratos orgânicos e da FAE, em concentração de 10 mg/mL diluído em DMSO a 10%. Obtendo-se as diluições seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 nas seguintes concentrações: 5 mg/mL; 2,50 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,62 mg/mL; 0,31 mg/mL; 0,15 mg/mL; 0,07 mg/mL; 0,03 mg/mL. Para o controle negativo, foi utilizado o DMSO a 10%, e para o controle positivo o cloranfenicol 30 µg/mL e cetoconazol 50 µg/mL, realizando-se a diluição seriada.

Foram necessárias 22 microplacas para o ensaio feito em triplicata com as 13 amostras de óleos essenciais frente aos 5 microrganismos escolhidos, 30 microplacas para os 18 extratos orgânicos e 1 microplaca para a FAE.

A Figura 11 esquematiza a maneira de como as microplacas foram padronizadas para a realização da atividade antimicrobiana.

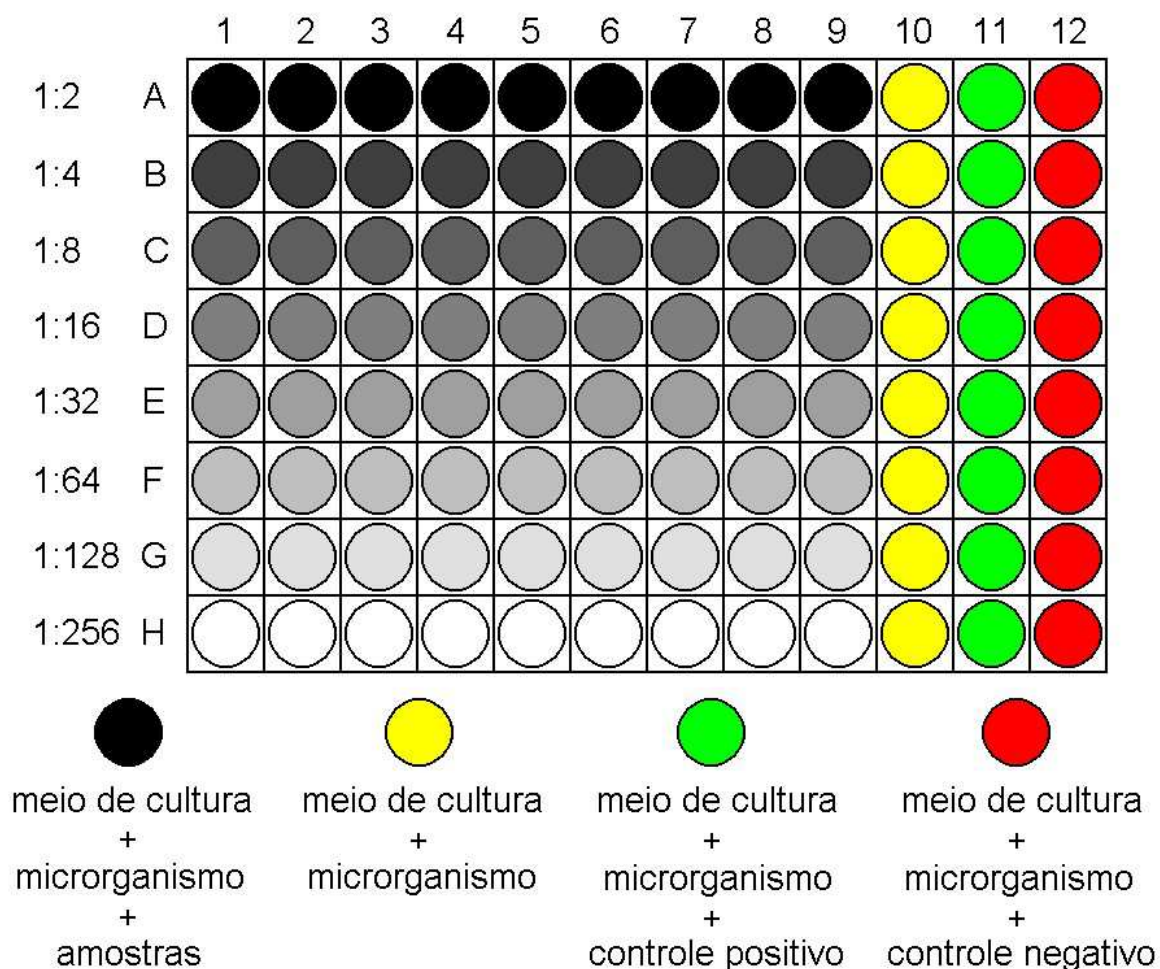


FIGURA 11 – PADRONIZAÇÃO DA MICROPLACA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

#### 4.14 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo animais, da Universidade Federal do Paraná - UFPR, sob o número 23075.078047/2011-71.

Para avaliação da atividade antiparasitária do óleo essencial, pombos-domésticos (*Columba livia*) infestados por ectoparasitos – pioelho de pombo, ordem Phthiraptera – foram selecionados do plantel da Fazenda Canguiri, da Universidade Federal do Paraná, e alojados em gaiolas em biotério no Hospital Veterinário da mesma instituição. Os pombos-domésticos foram submetidos à aplicação do produto formulado à base de óleo essencial de *E. cinerea* (3%) em forma de *spray*, cuja dose foi calculada por meio de extrapolação alométrica baseada na massa corporal do animal (PACHALY, BRITO, 2000). Para a evidenciação da morte ou repelência de ectoparasitos foi considerada a presença ou ausência desses ectoparasitos caídos no substrato das gaiolas, além da observação visual nas penas das aves, desde o dia de chegada até o dia de saída dos animais, totalizando, aproximadamente, 30 dias.

Para acompanhamento dos animais, foram analisados os exames hematológicos, efetuando-se coletas de sangue antes e após a aplicação do produto. Alguns dos animais em experimento apresentam-se em estado de anemia, devido a um dos fatores o estresse decorrido pela infestação de ectoparasitas.

#### 4.15 ESTUDOS DA FORMULAÇÃO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. cinerea*

##### 4.15.1 Preparação da formulação

Foi preparada uma formulação na forma farmacêutica líquida, na qual foi incorporado o óleo essencial puro proveniente das folhas de *E. cinerea*. Duas concentrações foram avaliadas: 3% e 0,3% de óleo essencial.

Para o preparo da base da formulação (p/p), foram pesados separadamente o propilenoglicol e álcool a 70%. Logo após, foi acrescentado o óleo essencial de *E. cinerea*, com agitação manual contínua até completa homogeneização desses componentes. Todos os componentes empregados na formulação estão descritos na Tabela 03.

TABELA 03 – COMPONENTES DA FORMULAÇÃO LÍQUIDA E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES.

Componentes	A	B
	Concentração (g %)	Concentração (g %)
Óleo essencial de <i>E. cinerea</i>	3	0,3
Propilenoglicol	15	15
Álcool a 70% q.s.p	100	100

Foi preparado também um branco nas mesmas concentrações da base da formulação, porém com a ausência do óleo essencial.

#### 4.15.2 Testes de estabilidade preliminares da formulação

Para avaliar a estabilidade da formulação nas duas concentrações diferentes, foram analisados parâmetros organolépticos e físico-químicos da solução através de metodologia de avaliação da estabilidade preliminar apresentada pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004; ANVISA, 2007). Desta forma, os parâmetros avaliados foram: aspecto, cor, odor e pH.

Para determinação da cor e aspecto os produtos foram avaliados por identificação visual; e para o odor, foi utilizado o olfato como sentido. A determinação do valor do pH foi realizada em pHmetro Digital PG 1800 - Gehaka. As leituras de cada amostra foram realizadas em triplicata. As observações foram feitas uma vez por semana no período de seis meses.

Cada formulação foi mantida em temperatura ambiente 20-25 °C, submetida ao aquecimento em estufa à temperatura de 40 °C e sob refrigeração à temperatura de 4 °C. Sendo ainda avaliado, durante os 6 ciclos, em quatro tipos de embalagens: frasco de vidro âmbar, frasco de vidro transparente, frasco PET âmbar, e frasco PET transparente, para acondicionamento e garantia de qualidade do produto durante da sua aplicação como antiparasitário em animais.

#### 4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa estatístico MSTATC (KOEHLER, 1996). Foi usada a Análise de Variância (ANOVA). Os testes de significância empregados para a comparação de médias foram o teste t de Student,

na comparação de dois tratamentos, e o teste de Tukey (baseado na DMS – Diferença Mínima Significativa) na comparação de três ou mais tratamentos e sempre que o teste de significância da ANOVA comprovar a existência de diferenças nos níveis de probabilidade de 95 e 99%.

Para os dados obtidos em triplicata, foi usado o teste adicional de significância – teste de Tukey –, sempre quando o F-Teste informar que há diferenças estatísticas na comparação de médias dos parâmetros.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 MORFOANATOMIA

Os resultados obtidos em relação à caracterização morfoanatômica foliar de *E. cinerea* foram baseados nas descrições macroscópica e microscópica.

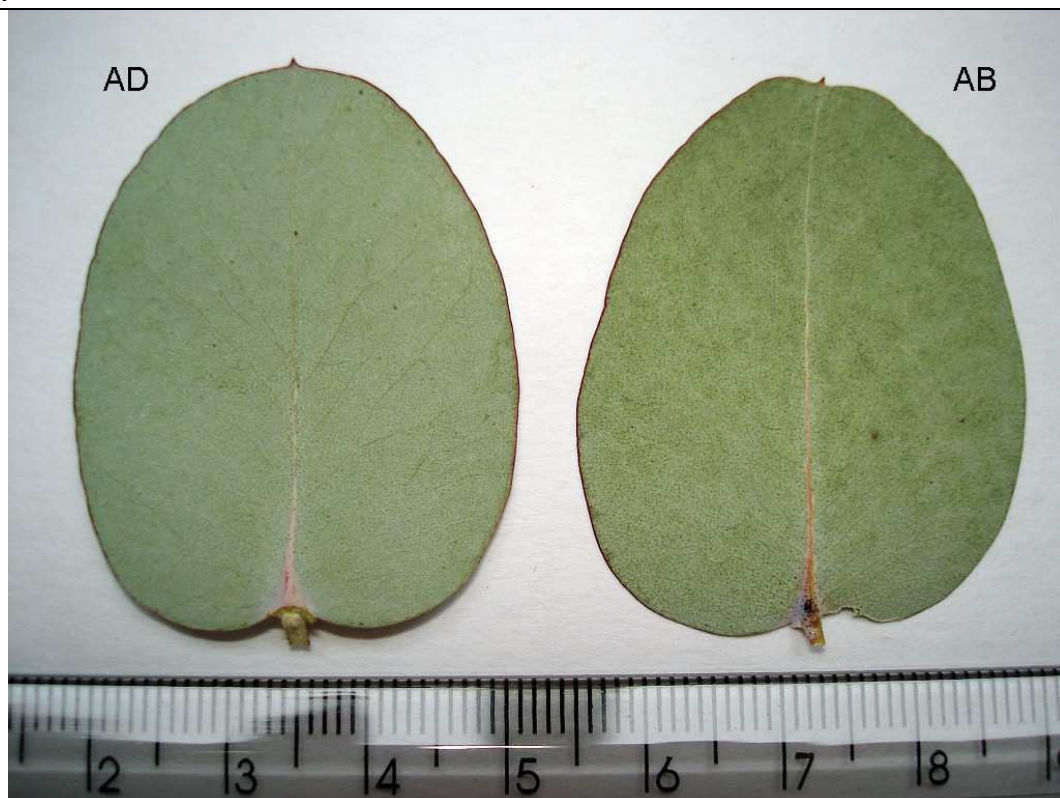
#### 5.1.1 Descrição macroscópica

A morfologia externa mostrou a folha de *E. cinerea* (Figura 12) como simples, simétrica, séssil, de forma oval oblonga, ápice mucronado e base cordiforme, com margem inteira e superfície lisa, filotaxia oposta cruzada, limbo íntegro, consistência coriácea, coloração verde acinzentado pela presença de cera em ambas as faces superior e inferior, o que torna difícil a diferenciação da epiderme adaxial com a abaxial. A margem de cada folha apresenta um contorno de avermelhado. O comprimento foliar (média  $\pm$  desvio padrão) mede  $4,68 \pm 0,83$  cm e a largura (média  $\pm$  desvio padrão)  $3,58 \pm 0,45$  cm.

Em relação à venação ou nervação, as folhas foram classificados como pinada, broquidódromo (Figura 13); ou seja a venação é pinada com uma nervura principal simples servindo como origem para a venação das demais ordens, e broquidódromo devido os arcos formando-se próximo à nervura marginal, esta classificação coincidiu com o que Hickey (1974) propôs nos seus estudos.



A



B

FIGURA 12 – *E. cinerea* – MORFOLOGIA EXTERNA: A. DESTAQUE DO RAMO FOLIAR; B. ASPECTO DAS FOLHAS MOSTRANDO SUPERFÍCIE ADAXIAL (AD) E ABAXIAL (AB).

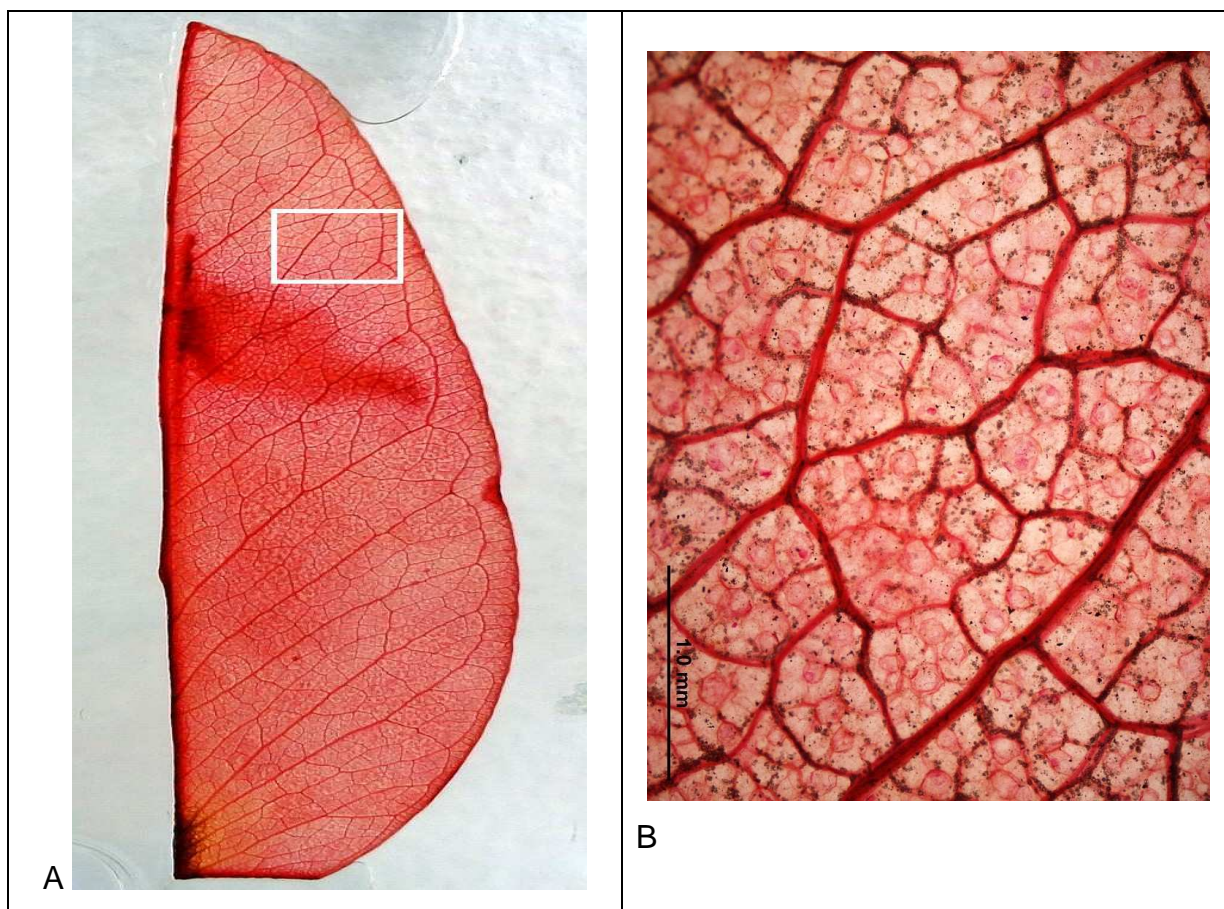


FIGURA 13 – VENAÇÃO DA FOLHA DE *E. cinerea*: A. PADRÃO GERAL; B. VÊNULAS NA REGIÃO INDICADA PELO RETÂNGULO NA FIG. 13-A.

### 5.1.2 Descrição microscópica

As células epidérmicas de formato poliédrico foram observadas por meio de secções paradérmicas da face adaxial e da face abaxial nas folhas de *E. cinerea*, e apresentaram estômatos em ambas as faces do limbo foliar, o que caracteriza a folha como anfiestomática (Figura 14). Os estômatos são do tipo anomocítico, igualmente aos encontrados em *E. globulus* (não há menção do estágio da folha), e não apresentam células subsidiárias (OLIVEIRA, AKISUE, AKISUE, 1991). Há ausência de tricomas, conforme descrito para *E. globulus* (JOHNSON, 1926), *E. grandis* (TUFFI-SANTOS *et al.*, 2008a) e *E. smithii* (FABROWSKI, 2002).

Na Figura 15, que mostra secções transversais da lâmina foliar de *E. cinerea*, verifica-se a presença de epiderme unisseriada recoberta por uma cutícula tanto na face adaxial quanto na face abaxial. O mesofilo foi caracterizado como heterogêneo simétrico (isolateral), sendo que o parênquima paliçádico apresentou-se voltado à

face adaxial e à face abaxial, enquanto que o parênquima lacunoso localizou-se na região central (Figura 15).

Os testes microquímicos demonstraram resultados compatíveis com os da literatura, evidenciando compostos fenólicos em *E. cinerea*. A presença de compostos fenólicos também é observada para a espécie *E. smithii* (FABROWSKI, 2002). Sobre o gênero *Eucalyptus* as células com compostos fenólicos são frequentes em todo mesofilo, sendo mais abundantes no parênquima, que envolve os feixes vasculares, e no floema (BONA, BOEGER, SANTOS, 2004). Dentro da classe dos compostos fenólicos, os taninos estão presentes em quantidade superior (METCALFE, CHALK, 1950; TUFFI-SANTOS *et al.*, 2008b).

A nervura central, em secção transversal, apresentou o sistema vascular com a presença de feixes do tipo bicolateral, com o xilema disposto de forma paralela ao floema externo e floema interno (Figura 16). Estes feixes vasculares estão envoltos por bainha esclerenquimática, a qual apresentou-se de modo bem pronunciada, sendo composta de três a cinco camadas de fibras esclerenquimáticas. Foi encontrado células colenquimáticas subepidérmicas, que também estão presentes em *E. globulus* (COSTA, 1986; FARMACOPEIA Brasileira, 1996).

Os feixes vasculares de menor porte do limbo mostraram-se colaterais e apresentaram uma extensão contendo células esclerenquimáticas, também foram observadas células colenquimáticas localizadas após da epiderme (Figura 17). Embora os feixes vasculares do limbo, em sua maioria, são classificados como bicolaterais, porém nem sempre o floema adaxial está claramente evidenciado (METCALFE, CHALK, 1950).

Foram observados na margem foliar idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio, agrupados ou solitários (Figura 18), muito comuns em representantes da família Myrtaceae, além de serem verificados nas proximidades de feixes vasculares (Figuras 16 e 17).

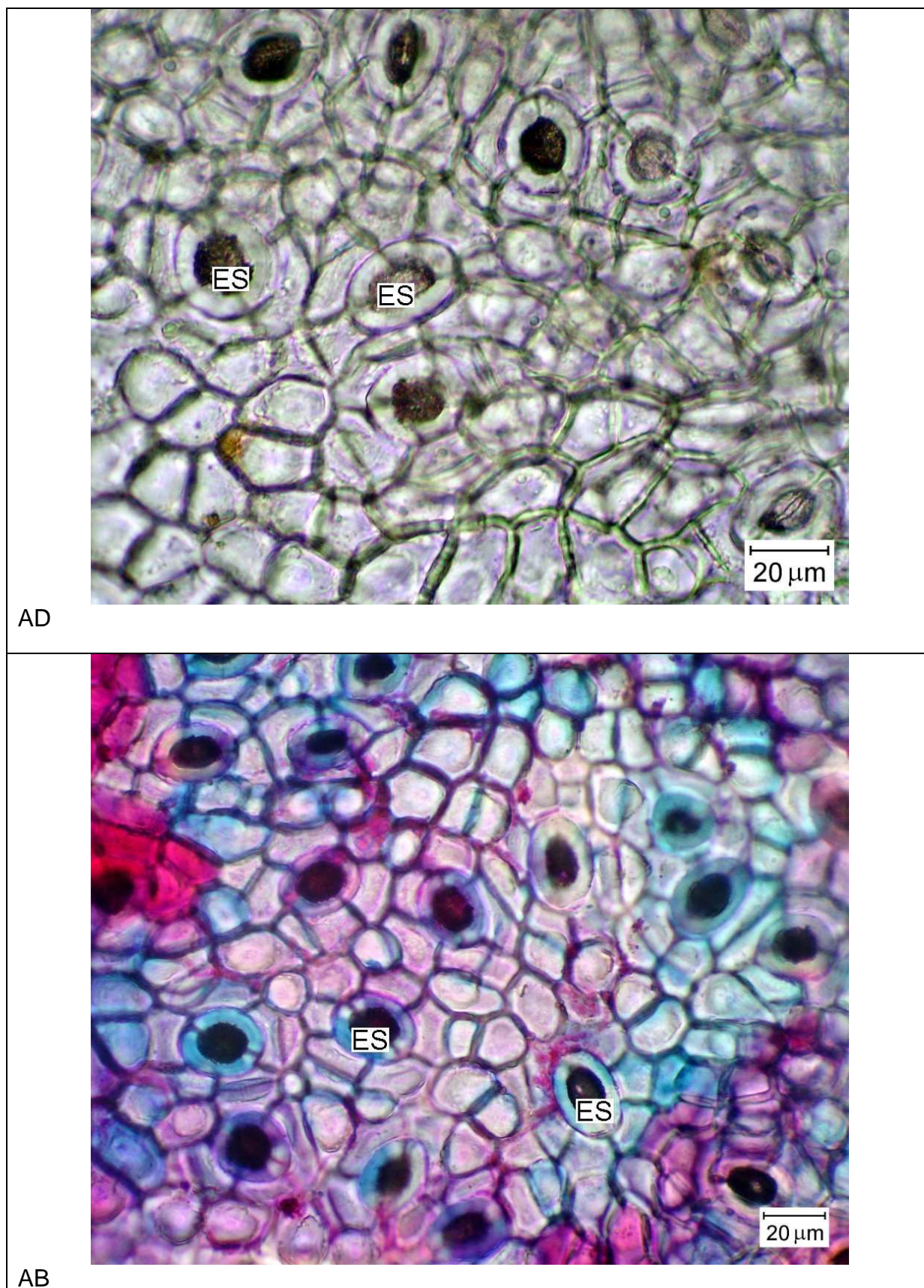
As cavidades secretoras com conteúdo lipofílico, com formato arredondado, são posicionadas abaixo da epiderme nas duas faces da folha e ao longo de todo o mesofilo (Figura 19). De acordo com Metcalfe e Chalk (1950), a presença de cavidades secretoras é uma característica típica da família Myrtaceae, sendo que estas são, geralmente, de origem esquizolisígena.

Na análise ultraestrutural, através da MEV, foi evidenciada a disposição da cera epicuticular e a presença de estômatos em ambas as faces da folha (Figura 20).

A cera epicuticular apresenta-se em diferentes formatos, em específico em espécies de eucaliptos é comum encontrar ceras do tipo cristalóide (BARTHLOTT *et al.*, 1998). Na espécie em estudo foi observado na superfície foliar adaxial e também na superfície abaxial a ocorrência de grande quantidade de cera epicuticular cristalóide em forma de túbulo, cujo atributo é o aspecto cilíndrico com a extremidade aberta (Figura 21).

Constatou-se para *E. globulus* ssp. *pseudoglobulus* (STEINBAUER, SCHIESTL, DAVIES, 2004) e para *E. globulus* ssp. *bicostata* (MALINOWSKI, NAKASHIMA, ALQUINI, 2009) que a prevalência desta cera epicuticular é maior na face abaxial. A presença expressiva de cera nas folhas é reconhecida por alguns insetos como local propício para deposição de seus ovos (STEINBAUER, SCHIESTL, DAVIES, 2004).





AB

FIGURA 14 - SECÇÕES PARADÉRMICAS DAS FACES ADAXIAL (AD) SEM CORANTE E ABAXIAL (AB) COM CORANTE DA FOLHA DE *E. cinerea* COM DESTAQUE AOS ESTÔMATOS ANOMOCÍTICOS (ES) E CÉLULAS EPIDÉRMICAS.



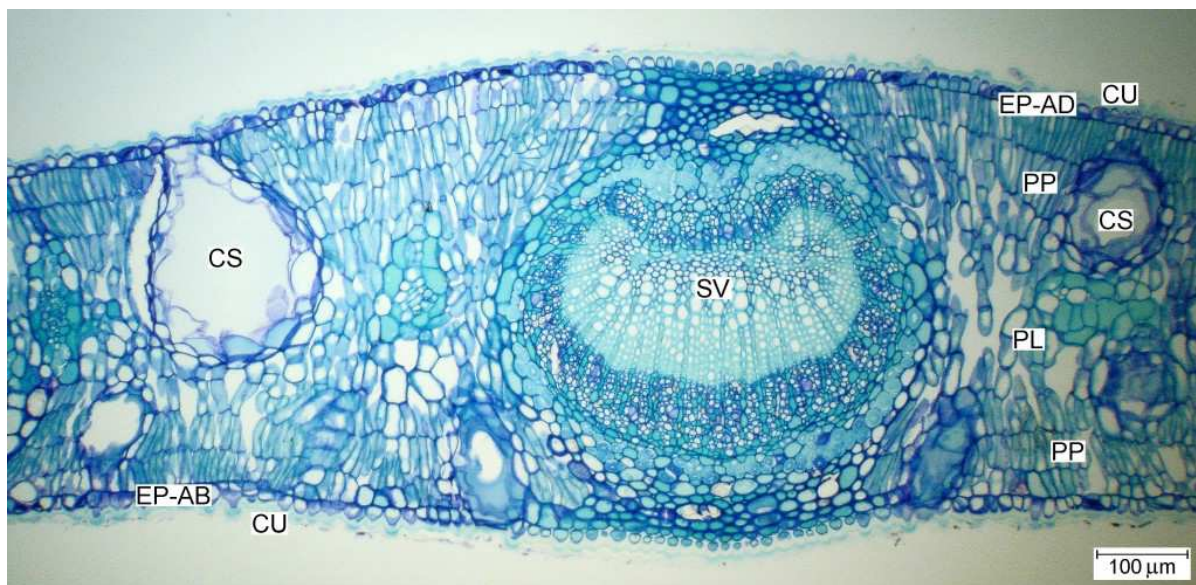


FIGURA 15 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA PRINCIPAL DA FOLHA DE *E. cinerea*, CAVIDADE SECRETORA (CS), CUTÍCULA (CU), EPIDERME PAPILOSA ADAXIAL (EP-AD), EPIDERME PAPILOSA ABAXIAL (EP-AB), PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO (PP), PARÊNQUIMA LACUNOSO (PL) E SISTEMA VASCULAR (SV).

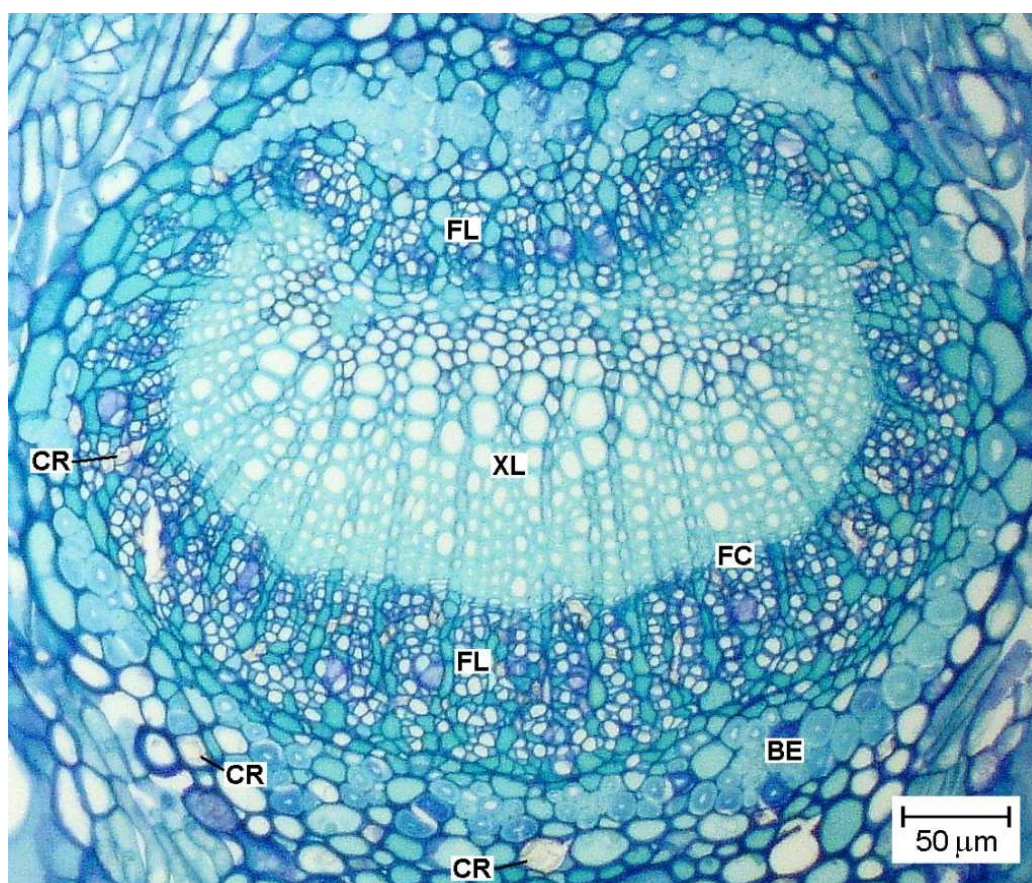


FIGURA 16 - DETALHE DA NERVURA CENTRAL DE *E. cinerea* MOSTRANDO SISTEMA VASCULAR, DESTACANDO FEIXE VASCULAR BICOLATERAL, FLOEMA (FL), XILEMA (XL), FAIXA CAMBIAL (FC), BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA (BE), E CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO (CR).





FIGURA 17 - SECÇÃO TRANSVERSAL DO LIMBO EVIDENCIANDO O FEIXE VASCULAR, XILEMA (XL), FLOEMA (FL), CÉLULAS ESCLERÊNQUIMÁTICAS (ESC), CÉLULAS COLÊNQUIMÁTICAS (COL), CRISTRAIS OXALATO DE CÁLCIO (CR), EPIDERME ADAXIAL (EP-AD) E EPIDERME ABAXIAL (EP-AB).





FIGURA 18 - SECÇÃO TRANSVERSAL DA MARGEM DA LÂMINA FOLIAR DE *E. cinerea* EVIDENCIANDO IDIOBLASTOS CONTENDO CRISTAIS DE OXALATO DE CÁLCIO (CR), CUTÍCULA (CU) E EPIDERME PAPILOSA (EP).

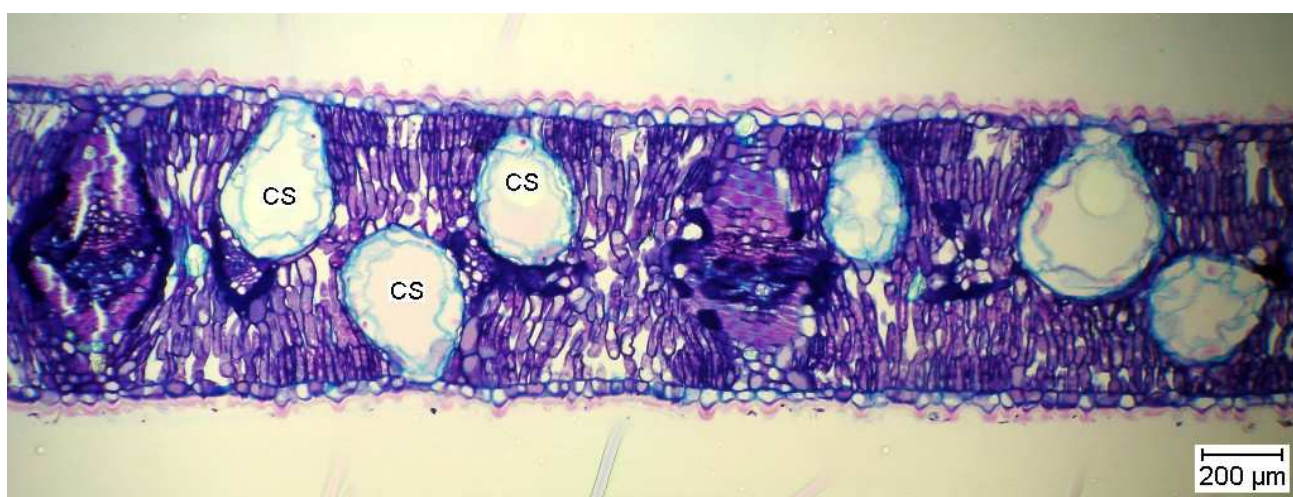


FIGURA 19 - CAVIDADES SECRETORAS (CS) DE ÓLEO ESSENCIAL COM FORMATO ARREDONDADO.



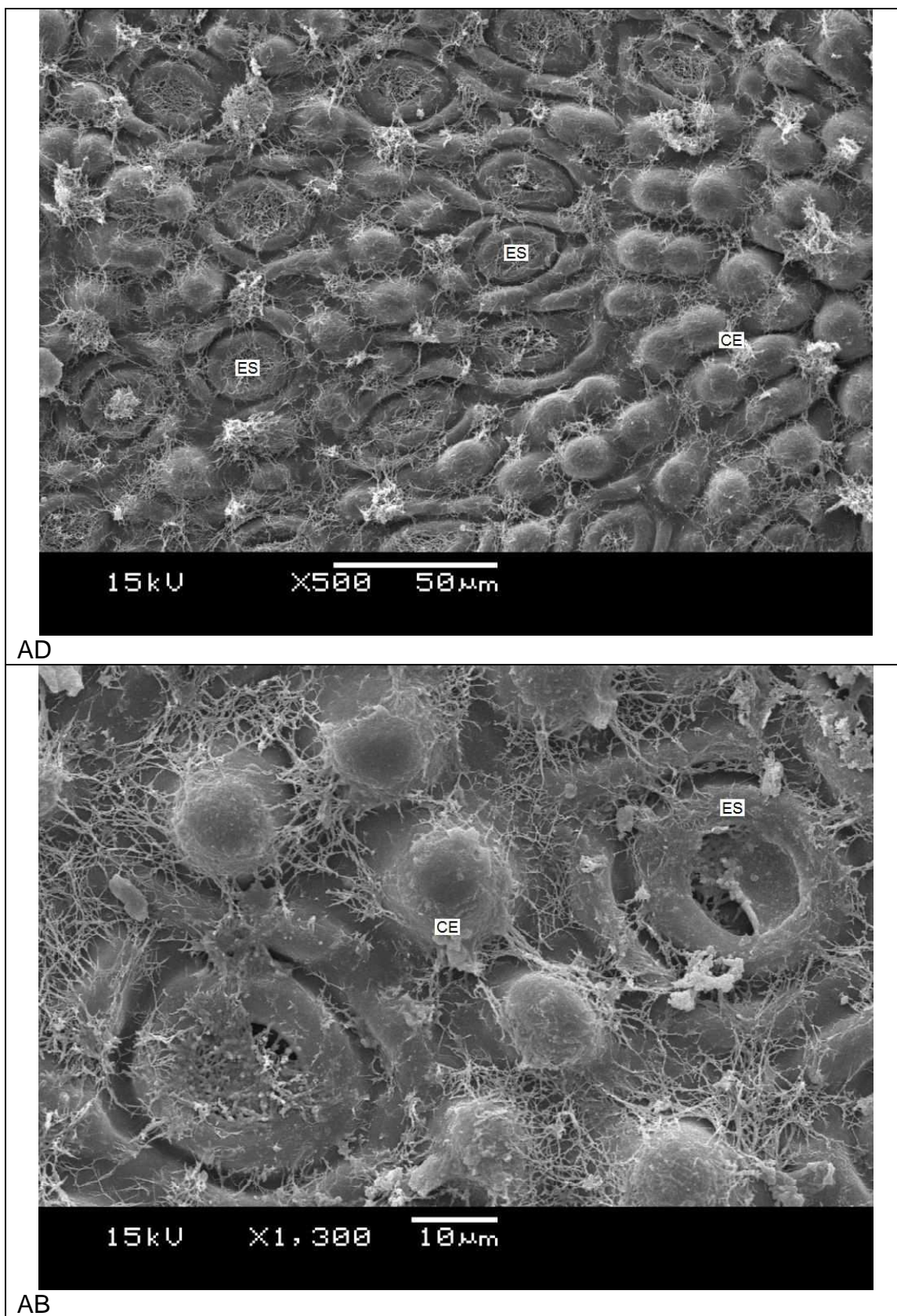
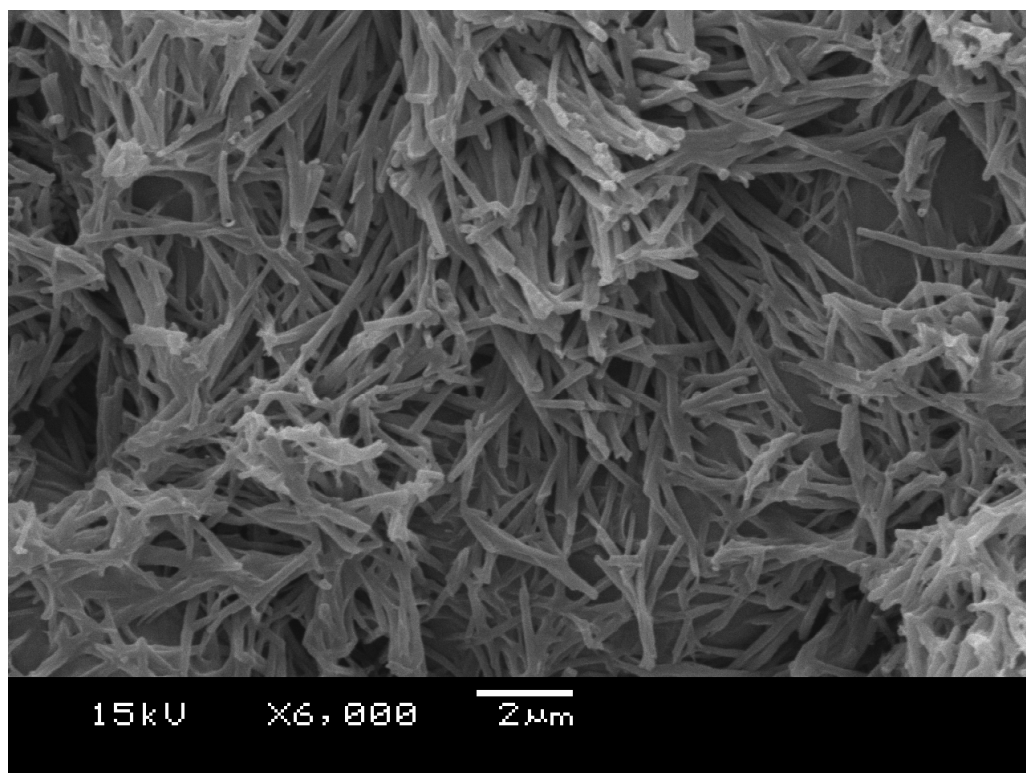
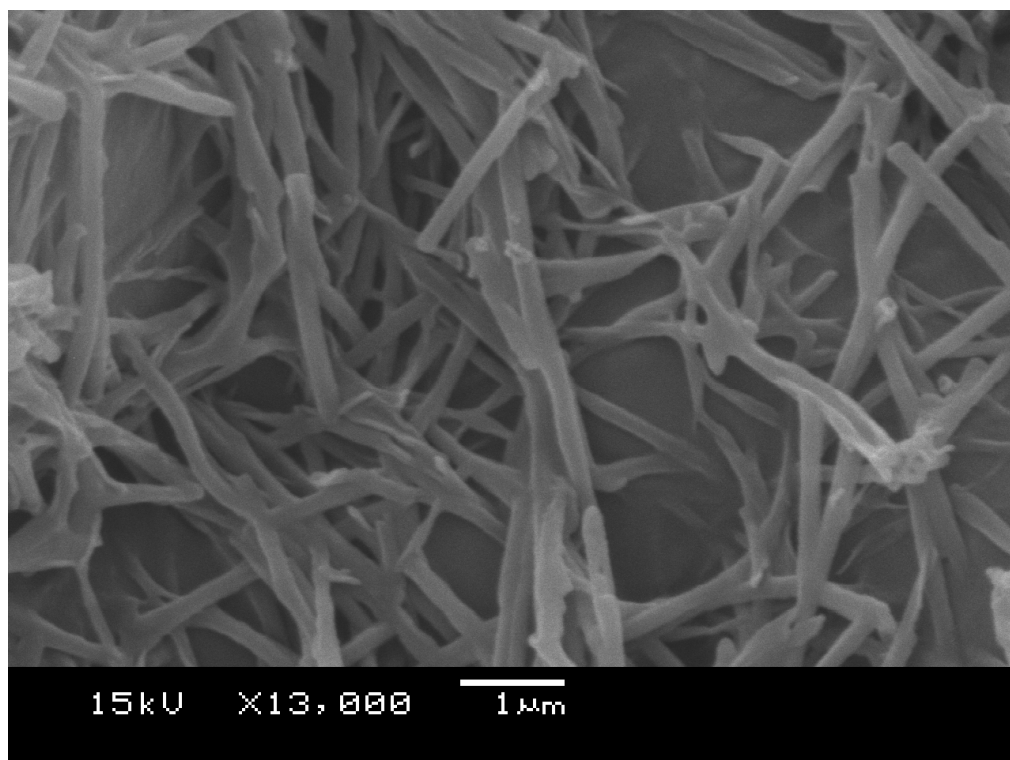


FIGURA 20 - FOTOMICROGRAFIA DA SUPERFÍCIE ADAXIAL (AD) E ABAXIAL (AB) DA FOLHA DE *E. cinerea* (MEV), DESTACANDO PRESENÇA DE CERA EPICUTICULAR (CE), ESTÔMATO ANOMOCÍTICO (ES) E PAREDE PERICLINAL EXTERNA DAS CÉLULAS EPIDÉRMICAS PAPILOSAS.



AD



AB

FIGURA 21 - MEV ILUSTRANDO CERA EPICUTICULAR TUBULAR DA FACE ADAXIAL (AD) E ABAXIAL (AB).

## 5.2 DETERMINAÇÃO DE ÁGUA DAS FOLHAS DE *E. cinerea*

A partir do ensaio de perda por dessecação, foi averiguada a determinação de água, conforme mostra a Tabela 04, para o material foliar fragmentado referente às coletas de outono, inverno, primavera e verão. O maior teor significativo de água foi registrado na época da primavera com aproximadamente 55% e o menor teor no inverno em 23,2130%.

TABELA 04 – DETERMINAÇÃO DE ÁGUA NAS FOLHAS FRESCAS DE *E. cinerea*.

Época da coleta	Teor de água nas folhas de <i>E. cinerea</i> (%)
Outono/2009	41,1187 ± 0,053 <sup>c</sup>
Inverno/2009	23,2130 ± 0,075 <sup>d</sup>
Primavera/2009	54,9431 ± 0,033 <sup>a</sup>
Verão/2010	44,2067 ± 0,017 <sup>b</sup>

Valores expressos em média ± desvio (n = 3).

Resultados seguidos por letras distintas diferem significativamente pelo método de Tukey (p < 0,05).

Segundo Farias (2007), o método gravimétrico é de simples execução, determinando o percentual volatilizado após a dessecação. No caso de plantas contendo elevado teor de óleo volátil, o percentual de perda de massa poderá ser consideravelmente maior, como ocorreu com *E. cinerea*.

Há outros métodos mais indicados que podem ser empregados, como: azeotrópico (destilação de tolueno) e volumétrico (Karl Fischer), que requerem equipamentos especiais e compreendem técnicas mais complexas (FARMACOPEIA Brasileira, 2000).

## 5.3 RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *E. cinerea*

Nas coletas executadas foi observado que na estação de outono além das folhas, frutos e flores, havia uma maior quantidade de botões florais comparando-se com as flores; na coleta do inverno os órgãos vegetais: folhas, flores e frutos estavam presentes; já no período da primavera houve ausência de flores; enquanto que no verão a presença de somente folhas.

O período de extração de cada óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* totalizou seis horas, observando-se que a primeira hora proporcionou um melhor rendimento

e, a partir da terceira hora, o volume de óleo essencial extraído era mínimo. Este fato coincide com os dados encontrados apenas de folhas secas em Franco (2005).

A Farmacopeia Brasileira (2000) estabelece para a espécie *Eucalyptus globulus* que o teor mínimo de óleo essencial das folhas é de 0,8% (v/m), tendo como substância química principal o 1,8-cineol, cujos valores devem estar acima de 70% para ser considerado um óleo medicinal.

Conforme a Figura 22, as amostras de folhas frescas de *E. cinerea* apresentaram rendimentos de óleos inferiores aos das amostras de folhas secas, sendo que na estação do verão o rendimento de óleo essencial das folhas secas merece destaque devido seu alto valor médio de 5,02% (v/m). O teor de óleos essenciais das folhas frescas e secas foram superiores comparando-se aos dados da literatura referentes à mesma espécie, cujos rendimentos extraídos foram de 0,26% (v/m) e 2,87% (m/m) (ZRIRA *et al.*, 2004; BABU, SINGH, 2009).

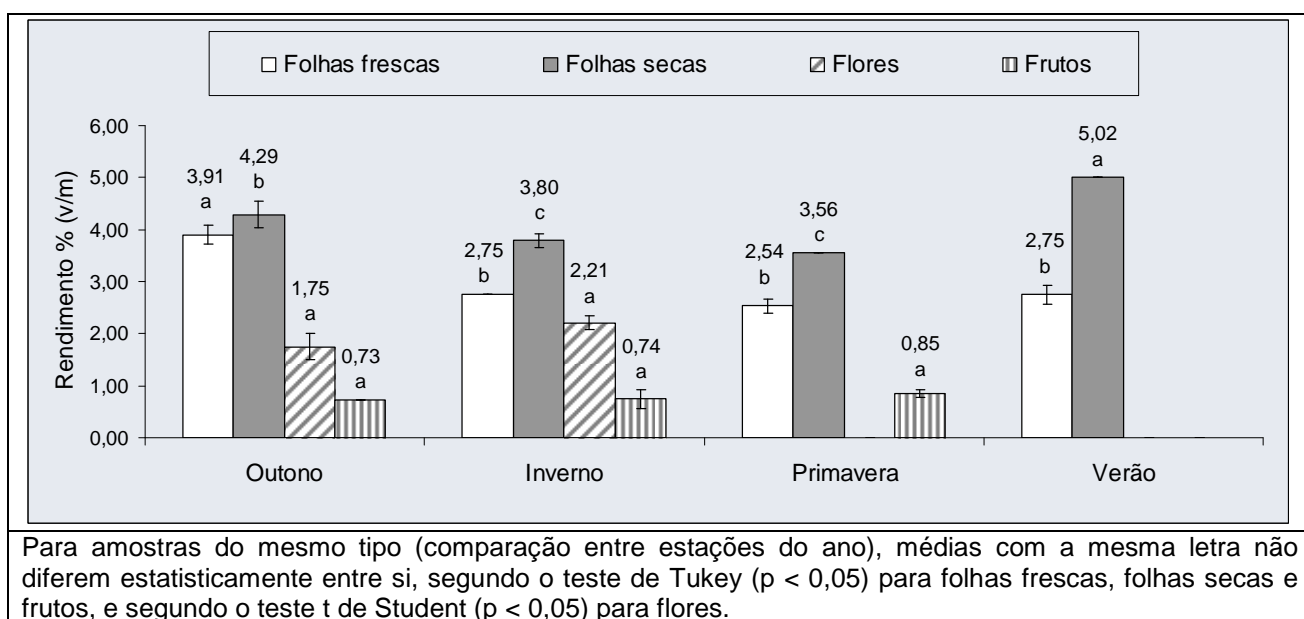


FIGURA 22 - RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS, FLORES E FRUTOS DE *E. cinerea* COM VARIAÇÃO SAZONAL.

O teor de óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos vegetais secos e frescos da espécie vegetal, acompanhado durante as quatro estações do ano, apresentou elevados valores de rendimento, com destaque para folhas secas no verão. Este fato pode ser um indicativo que viabilize a continuidade dos estudos com este óleo essencial, com a possibilidade de utilizá-lo como matéria-prima na indústria farmacêutica, cosmética, nutricional e veterinária, entre outras áreas afins.

Os rendimentos dos óleos essenciais são influenciados pela sazonalidade, pela parte aérea do vegetal coletado e pelo processo de secagem. Além destes, outros fatores podem alterar os rendimentos e a composição química dos óleos essenciais: temperatura, disponibilidade hídrica, estágio de desenvolvimento do vegetal, variações genéticas, clima, ambiente, condições geográficas, radiação UV, nutrientes do solo, entre outros (GOBBO-NETO, LOPES, 2007; MENDES *et al.*, 2008).

#### 5.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As análises físico-químicas foram realizadas para estabelecer parâmetros de controle de qualidade dos óleos voláteis de *E. cinerea*.

Dados referentes à densidade relativa, índice de refração dos óleos essenciais mostraram valores semelhantes estatisticamente tanto entre períodos sazonais quanto entre as partes aéreas analisadas (Tabela 05). Para os resultados referentes ao poder rotatório, analisados somente para folhas (frescas e secas), houve diferença significativa entre o período outono-inverno e o período primavera-verão, porém em cada estação do ano não houve diferença significativa entre os dois tipos de amostra analisados (Tabela 05). Os dados físico-químicos referentes às folhas secas são condizentes com Moreira *et al.* (1980) e Zrira *et al.* (2004).

Os resultados verificados para a solubilidade em etanol dos óleos essenciais extraídos a partir de folhas frescas e secas, flores e frutos durante as estações do ano estão, respectivamente, indicados na Tabela 06. Constatou-se que em todas as amostras é necessária mais de uma parte de volume de etanol 70% para que o óleo se torne miscível.

TABELA 05 – DENSIDADE RELATIVA, ÍNDICE DE REFRAÇÃO E PODER ROTATÓRIO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS PARTES AÉREAS DE *E. cinerea*.

Estação	Órgão vegetal	Densidade relativa (g/mL)	Índice de refração	Poder rotatório
Outono	FF	$0,9125 \pm 0,031^a$	$1,4594 \pm 0,072^a$	$+ 2,3780 \pm 0,128^a$
	FS	$0,9134 \pm 0,036^a$	$1,4598 \pm 0,048^a$	$+ 2,3483 \pm 0,096^a$
	FL	$0,9097 \pm 0,047^a$	$1,4598 \pm 0,057^a$	nt
	FR	$0,9093 \pm 0,029^a$	$1,4642 \pm 0,091^a$	nt
Inverno	FF	$0,8990 \pm 0,027^a$	$1,4585 \pm 0,019^a$	$+ 2,4249 \pm 0,103^a$
	FS	$0,9001 \pm 0,058^a$	$1,4588 \pm 0,037^a$	$+ 2,3941 \pm 0,086^a$
	FL	$0,8991 \pm 0,037^a$	$1,4597 \pm 0,038^a$	nt
	FR	$0,9077 \pm 0,041^a$	$1,4638 \pm 0,083^a$	nt
Primavera	FF	$0,9069 \pm 0,012^a$	$1,4587 \pm 0,052^a$	$+ 1,9351 \pm 0,147^b$
	FS	$0,9093 \pm 0,062^a$	$1,4583 \pm 0,028^a$	$+ 1,8970 \pm 0,111^b$
	FR	$0,9013 \pm 0,055^a$	$1,4601 \pm 0,097^a$	nt
Verão	FF	$0,9044 \pm 0,033^a$	$1,4596 \pm 0,044^a$	$+ 1,8796 \pm 0,093^b$
	FS	$0,9077 \pm 0,095^a$	$1,4599 \pm 0,055^a$	$+ 1,8398 \pm 0,101^b$

FF = folhas frescas, FS = folhas secas, FL = flores, FR = frutos.

nt = não testado.

Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 3).

Para cada coluna da tabela, valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo método de Tukey (p < 0,05).

TABELA 06 – SOLUBILIDADE EM ETANOL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DOS ÓRGÃOS VEGETAIS DE *E. cinerea*.

Época	Amostra	EtOH 70%	EtOH 80%	EtOH 90%	EtOH 100%
Outono	FF	1:3	1:1	1:1	1:1
	FS	1:3	1:1	1:1	1:1
	FL	1:3	1:1	1:1	1:1
	FR	1:3	1:1	1:1	1:1
Inverno	FF	1:3	1:1	1:1	1:1
	FS	1:3	1:1	1:1	1:1
	FL	1:3	1:1	1:1	1:1
	FR	1:3	1:1	1:1	1:1
Primavera	FF	1:3	1:1	1:1	1:1
	FS	1:2	1:1	1:1	1:1
	FR	1:4	1:1	1:1	1:1
Verão	FF	1:5	1:1	1:1	1:1
	FS	1:5	1:1	1:1	1:1

FF = folhas frescas, FS = folhas secas, FL = flores, FR = frutos.

## 5.5 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS - CG/EM

Os resultados obtidos para a composição química dos óleos essenciais das folhas, flores e frutos de *E. cinerea* estão descritos na Tabela 07. A composição química dos óleos essenciais de diferentes partes da mesma planta pode diferir amplamente (BURT, 2004).

O eucaliptol (1,8-cineol) é o componente químico majoritário dos óleos das folhas da maioria das espécies medicinais de *Eucalyptus*, tais como *E. staigeriana* (GILLES *et al.*, 2010), *E. globulus* (MACIEL *et al.*, 2010; TYAGI, MALIK, 2011), *E. urophylla* (CHENG *et al.*, 2009). No entanto, outras espécies de *Eucalyptus* não têm como principal componente o 1,8 cineol, sendo elas: *E. dives* – piperitone, *E. olida* –



(*E*)-metil cinamato (GILLES *et al.*, 2010), *E. camaldulensis* –  $\alpha$ -pineno (CHENG *et al.*, 2009), *E. staigeriana* – limoneno (MACIEL *et al.*, 2010), *E. citriodora* – beta-citronelal (MACIEL *et al.*, 2010), *Eucalyptus tereticorni* – *p*-cimeno (ALITONOU *et al.*, 2004).

O principal composto volátil identificado em todas as partes aéreas de *E. cinerea* coletadas sazonalmente foi 1,8-cineol, atingindo uma concentração de até 85,32%. Além deste composto, merecem destaque:  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\alpha$ -terpineol, acetato de  $\alpha$ -terpinila.

Outros estudos constataram que os principais componentes do óleo essencial de *E. cinerea* obtidos de folhas secas de um único período foram: 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno (ZRIRA, 2004). Franco *et al.* (2005) detectaram também o limoneno e  $\alpha$ -terpineol.

Nas essências das folhas frescas de *E. cinerea*, a maior variação observada de 1,8-cineol foi de 60,69% a 83,61% nas estações de verão e inverno respectivamente. Outro composto majoritário desta mesma amostra de óleo essencial foi acetato de  $\alpha$ -terpinila com porcentagens que variaram de 5,38% a 20,44% no inverno e no verão respectivamente.

Nos óleos aromáticos de folhas secas os teores máximos e mínimos de 1,8-cineol e acetato de  $\alpha$ -terpinila também foram observados nas estações de inverno e verão. Este fato pode estar relacionado à temperatura, umidade relativa, incidência de raios UV, e outros fatores ambientais (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

Os resultados encontrados por Babu e Singh (2009) no conteúdo de 1,8-cineol na espécie *E. cinerea* (região do Himalaya) foram superiores nas folhas frescas em relação às secas, resultados divergentes ao nosso trabalho.

O composto delta-3-careno foi detectado exclusivamente nas flores tanto no outono como no inverno nas mesmas proporções. O 1,8-cineol prevaleceu em relação aos outros compostos, assim como nas folhas e frutos. De acordo com Giamakis *et al.* (2001), os quais relataram a composição química do óleo das flores de *E. camaldulensis*, os componentes que se sobressaíram foram 1,8-cineol e beta-pineno.

Nas amostras de óleos voláteis referentes aos frutos de *E. cinerea*, o eucaliptol (1,8-cineol) foi o componente predominante, o que difere da espécie *E. globulus* em que o aromadendrene foi o principal composto nos frutos (MULYANINGSIH *et al.*, 2010).

TABELA 07 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS PARTES AÉREAS DE *E. cinerea* COM VARIAÇÃO SAZONAL.

Compostos	IK	Área %												
		Folhas frescas				Folhas secas				Flores		Frutos		
		OUT	INV	PRI	VER	OUT	INV	PRI	VER	OUT	INV	OUT	INV	PRI
α-pineno	940	3,55	4,97	3,44	2,41	4,02	5,73	3,13	3,10	4,83	8,24	10,03	10,13	6,19
delta-3-careno	1014	-	-	-	-	-	-	-	-	1,11	1,10	-	-	-
o-cimeno	1033	-	0,39	-	0,07	0,47	-	-	0,40	2,31	1,45	3,61	1,98	2,32
limoneno	1038	3,20	3,32	2,07	2,35	4,43	3,29	1,46	3,78	3,72	2,98	3,29	2,16	1,86
1,8-cineol	1041	74,60	83,61	74,99	60,69	73,92	83,95	85,32	69,97	73,07	78,76	71,56	80,96	62,57
NI	1186	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00	-	-
NI	1187	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,70
gama-terpineol	1193	0,14	-	-	0,91	-	-	-	0,38	1,50	-	0,79	-	1,77
NI	1199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,57
α-terpineol	1207	5,88	1,73	6,11	11,72	4,88	1,28	2,59	6,98	4,70	1,78	4,42	1,72	10,80
metil geranato	1325	-	-	-	0,98	0,17	-	-	0,11	-	-	-	-	-
acetato de α-terpinila	1360	12,64	5,38	12,57	20,44	11,11	4,82	7,23	14,50	8,76	5,69	5,28	3,04	13,21
prezizaeno	1443	-	0,61	0,83	0,43	0,99	0,93	0,27	0,79	-	-	-	-	-

IK ou IR: Índice de Kováts ou índice de retenção relativo à série *n*-alcanos na coluna apolar CP-Sil 8 low bleeding.

NI: não identificado.

OUT: outono; INV: inverno; PRI: primavera; VER: verão.

Nas Figuras 23 a 26, ilustram os cromatogramas de CG das amostras coletadas sazonalmente.

Os espectros de massas dos principais compostos dos óleos essenciais de *E. cinerea* estão destacados na Figura 27.

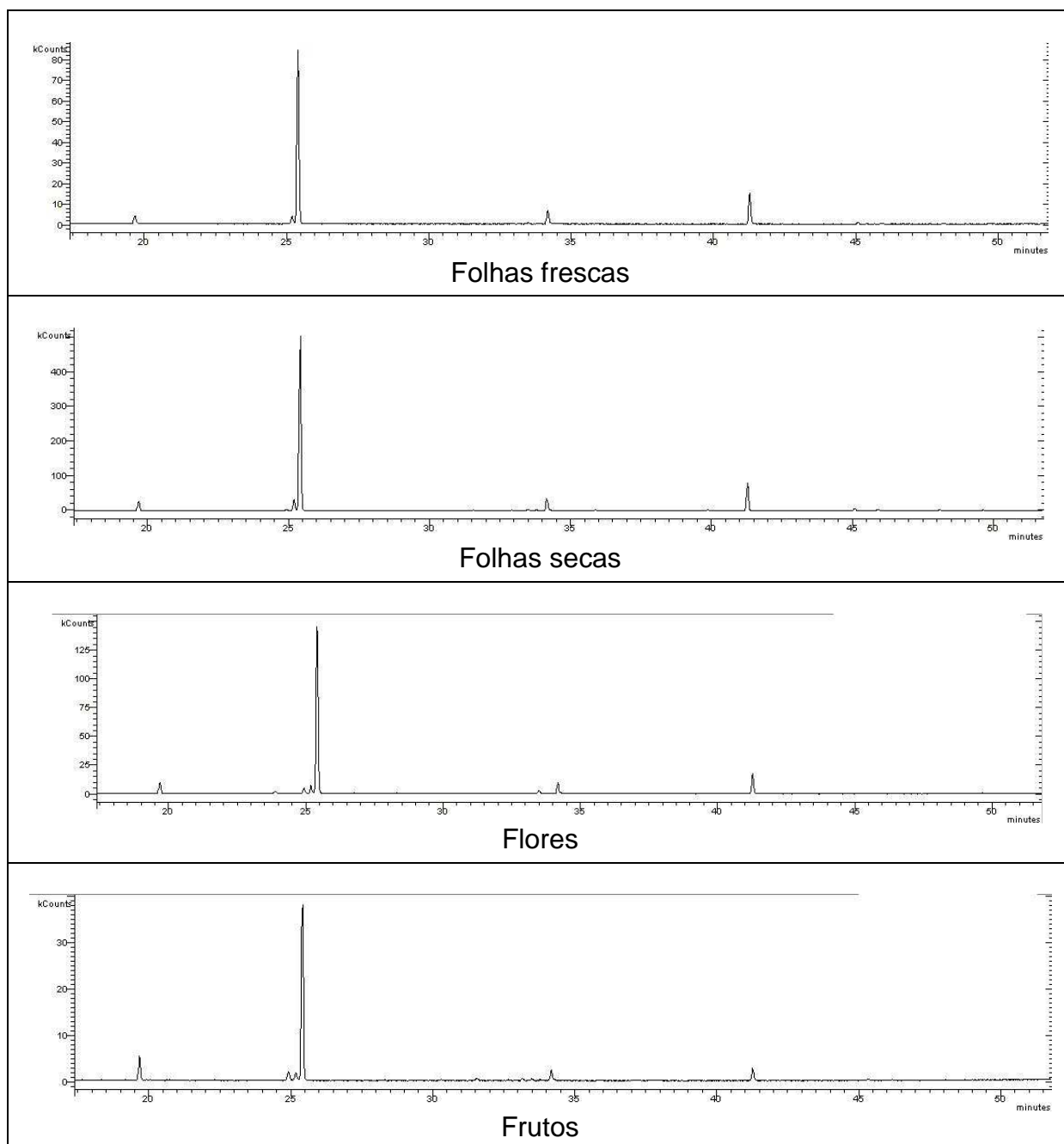


FIGURA 23 - CROMATOGRAMAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *E. cinerea*: COLETA DE OUTONO.

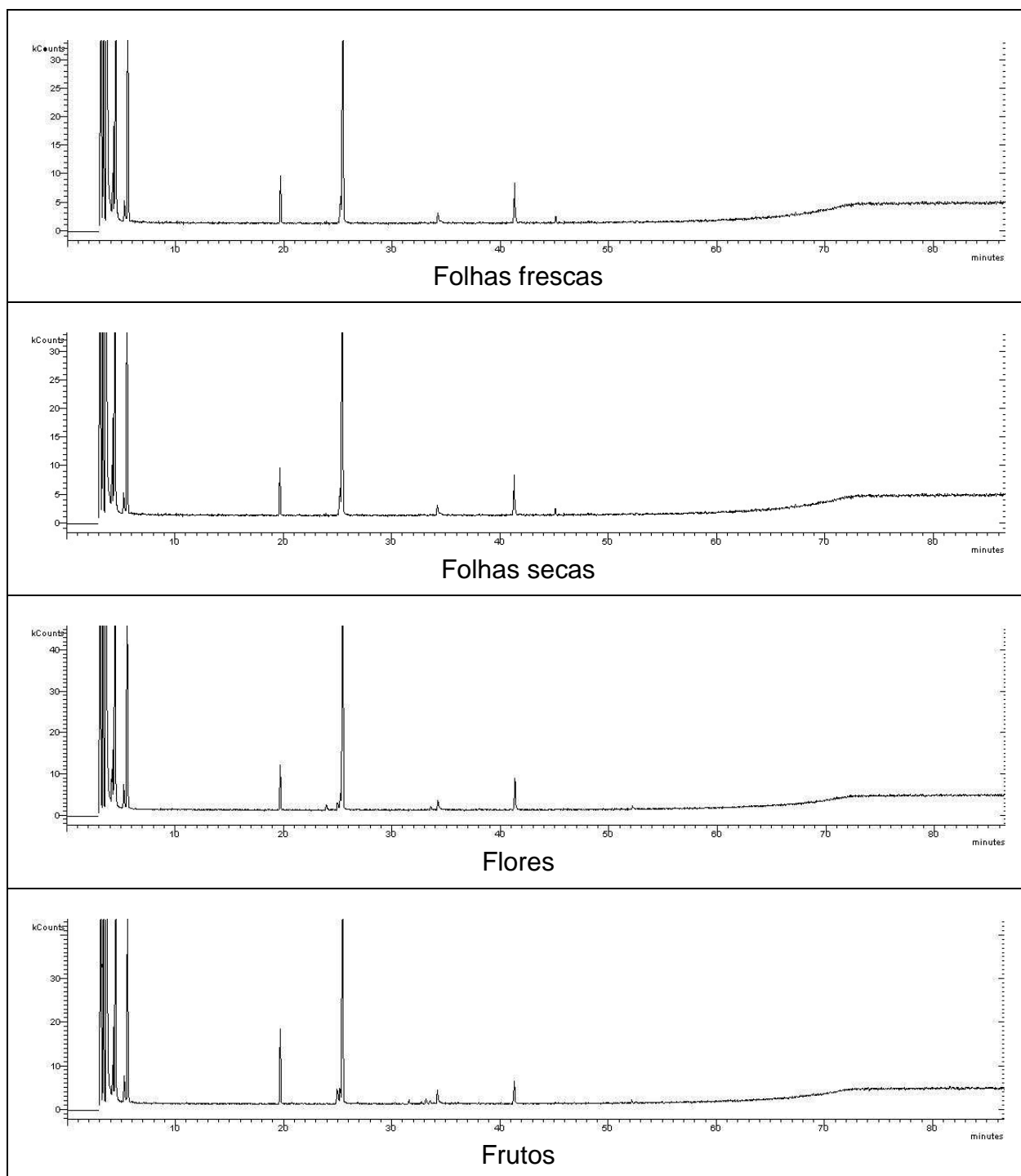


FIGURA 24 - CROMATOGRAMAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *E. cinerea*: COLETA DE INVERNO.

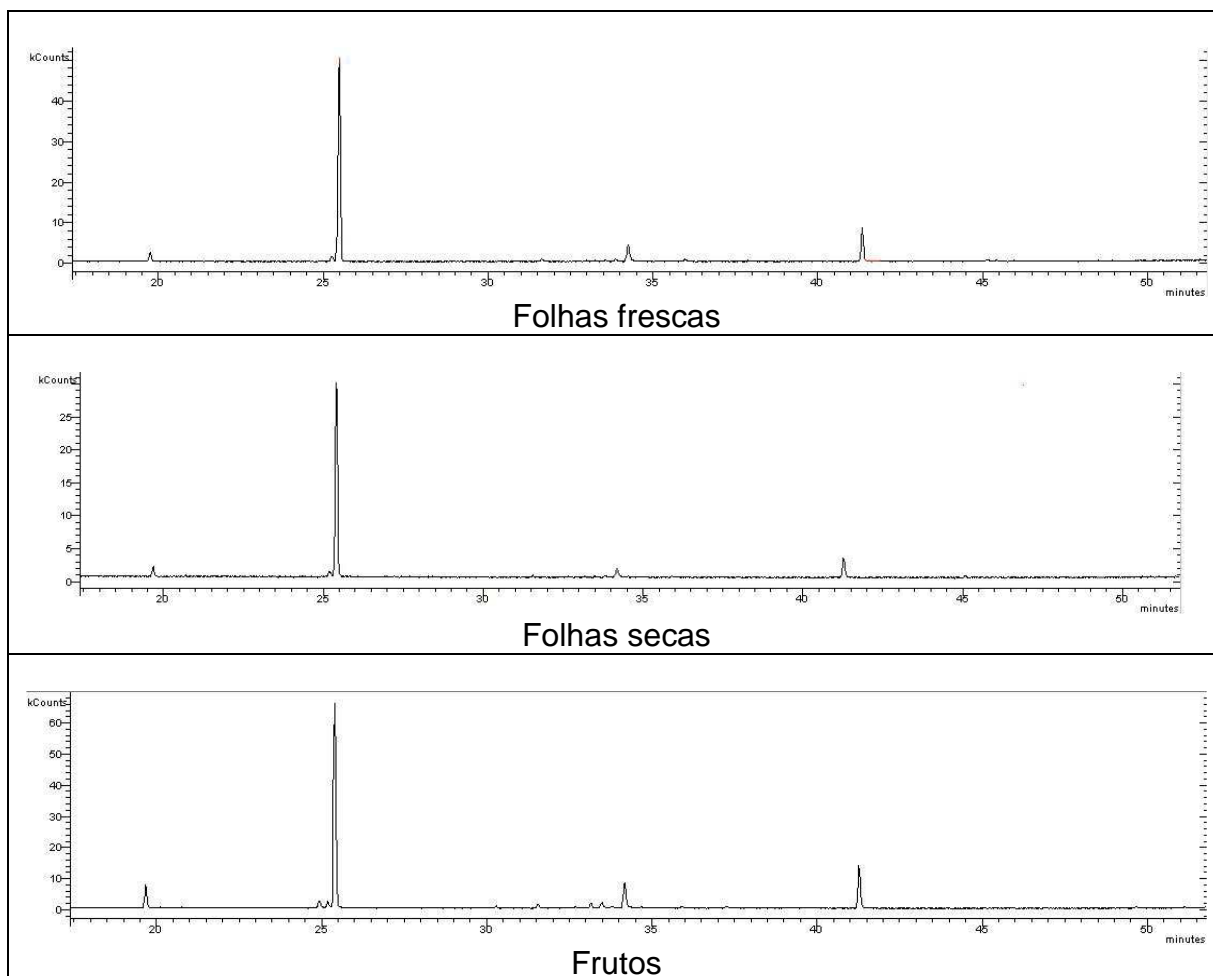


FIGURA 25 - CROMATOGRAMAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *E. cinerea*: COLETA DE PRIMAVERA.

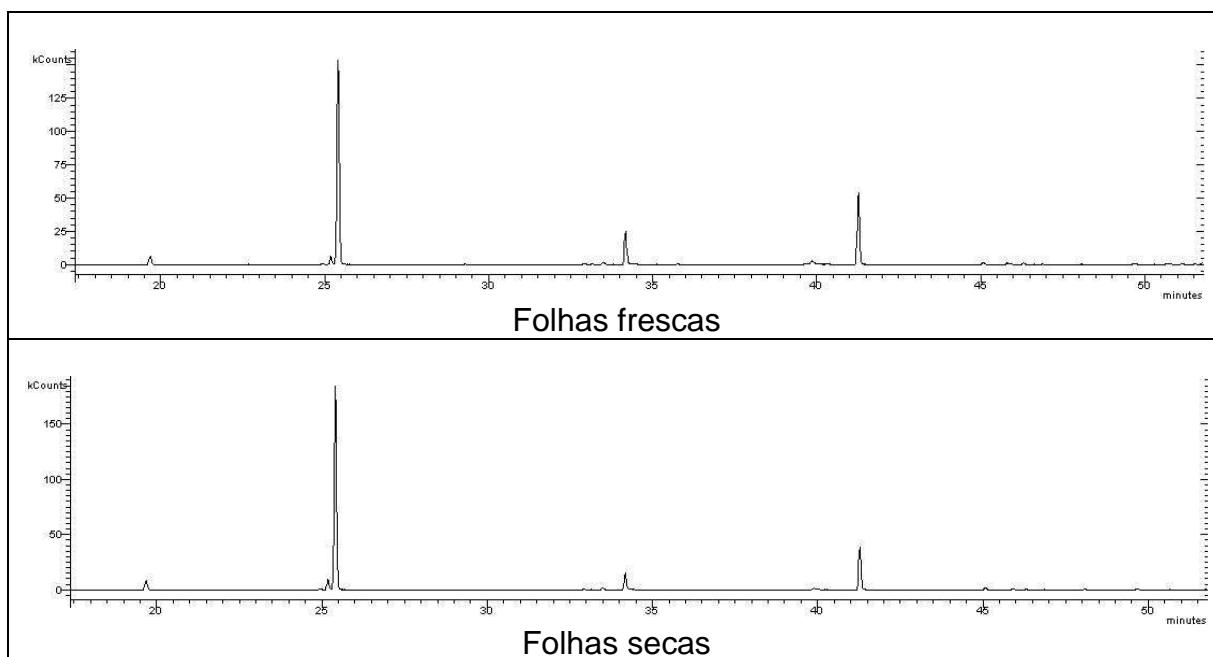


FIGURA 26 - CROMATOGRAMAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *E. cinerea*: COLETA DE VERÃO.

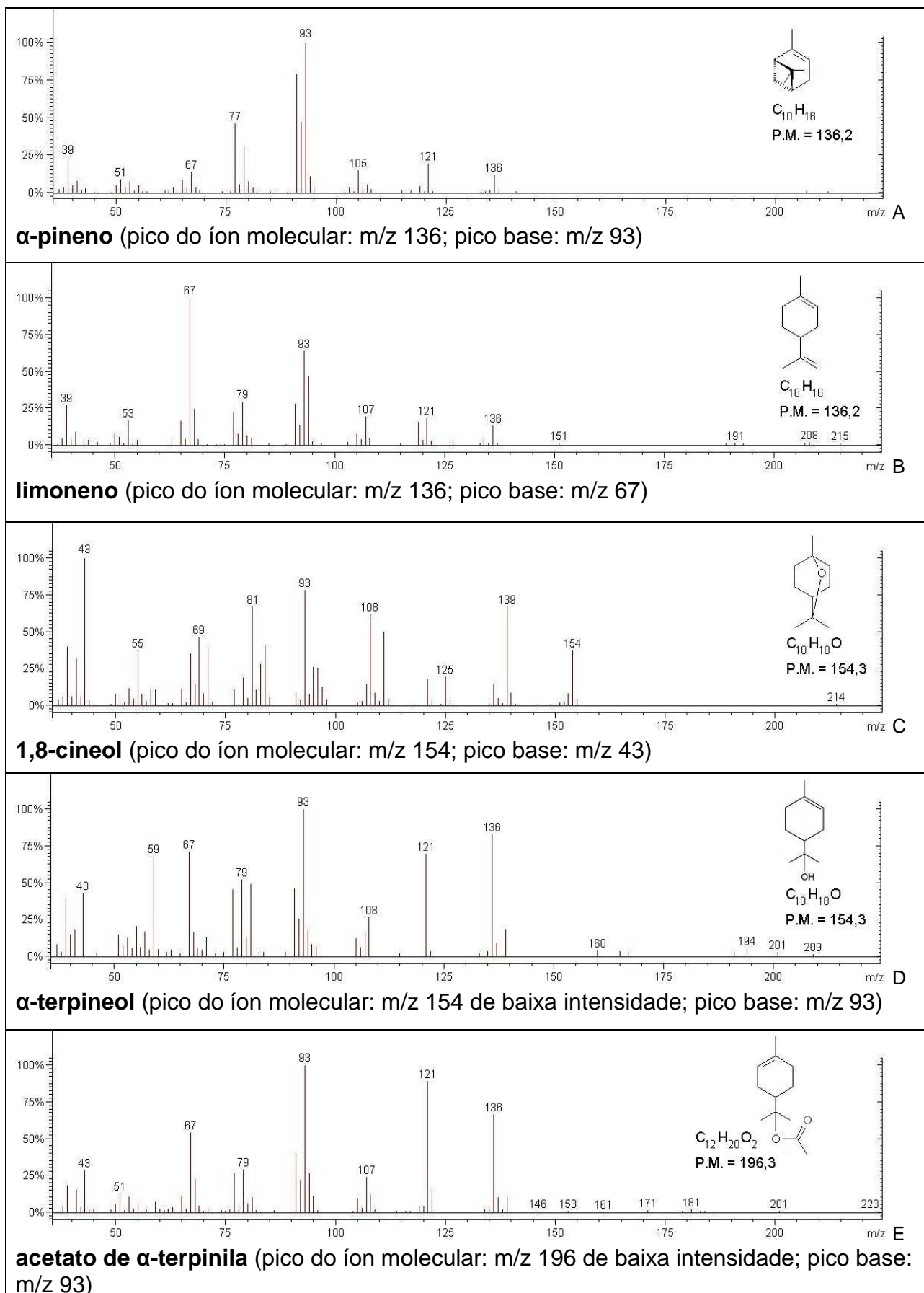


FIGURA 27 - ESPECTROS DE MASSAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS IDENTIFICADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *E. cinerea*.

No espectro de massas por impacto de elétrons, gerado por um computador na forma de um gráfico de barras, a abundância relativa dos picos, apresentada como percentagem do pico base (100 %), é lançada contra a razão massa/carga ( $m/z$ ). O gráfico tem a vantagem de mostrar sequências de fragmentação que com a prática podem ser facilmente reconhecidas.

O espectro de massas referente à Figura 27-A indica, com base na literatura (ADAMS, 2007) e na espectroteca NIST 2008, a presença no óleo essencial do composto  **$\alpha$ -pineno**. O pico do íon molecular apresenta  $m/z=136$ , confirmando a fórmula  $C_{10}H_{16}$ . O pico de  $m/z=93$  para o  $\alpha$ -pineno é provavelmente produzido por uma estrutura de fórmula  $C_7H_9^+$  formada por isomerização, seguida por clivagem alílica (SILVERSTEIN, 2000).

O espectro da Figura 27-B indica a presença do **limoneno** no óleo essencial de *E. cinerea*. O pico do íon molecular apresenta  $m/z=136$ , o que evidencia a fórmula  $C_{10}H_{16}$ . O pico com  $m/z=121$  [M-15], confirma a presença de um grupo metila como ramificação. O pico  $m/z=93$  é provavelmente produzido por uma estrutura de fórmula  $C_7H_9^+$ . Alkenos cíclicos, como é o caso do limoneno, apresentam um modo especial de quebra, semelhante a uma reação *retro*-Diels-Alder com  $m/z=68$  (Figura 28) (SILVERSTEIN, 2000).

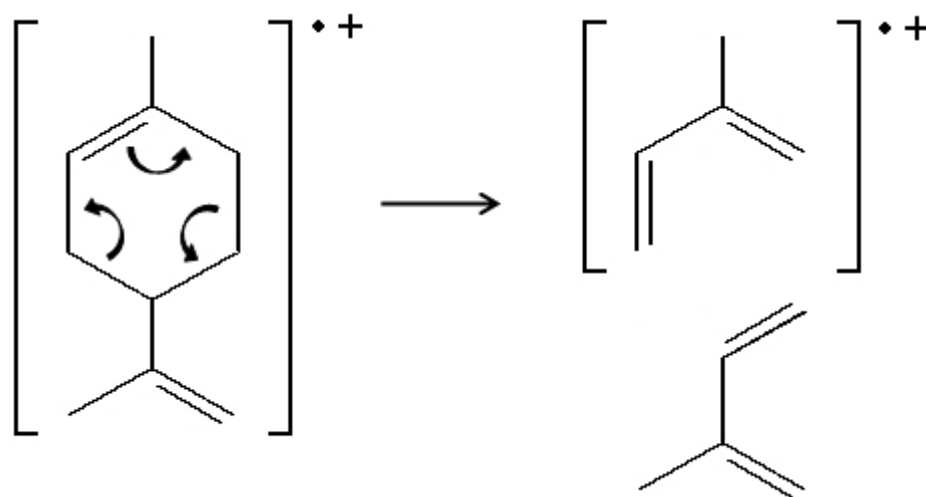


FIGURA 28 - FRAGMENTAÇÃO TIPO REAÇÃO *retro*-DIELS-ALDER DO LIMONENO.

Pela inspeção do espectro de massas e identificação do pico do íon molecular, cujo  $m/z$  foi destacado na Figura 27-C, pode-se dizer que a massa

molecular do composto identificado é 154,3 g/mol, que corresponde à massa molecular do **1,8-cineol**. Analisando o padrão de fragmentação seguido pela substância representado pelos fragmentos iônicos típicos ilustrados na Figura 29 e comparando-os com a biblioteca NIST, conclui-se como pertencendo realmente ao 1,8-cineol.

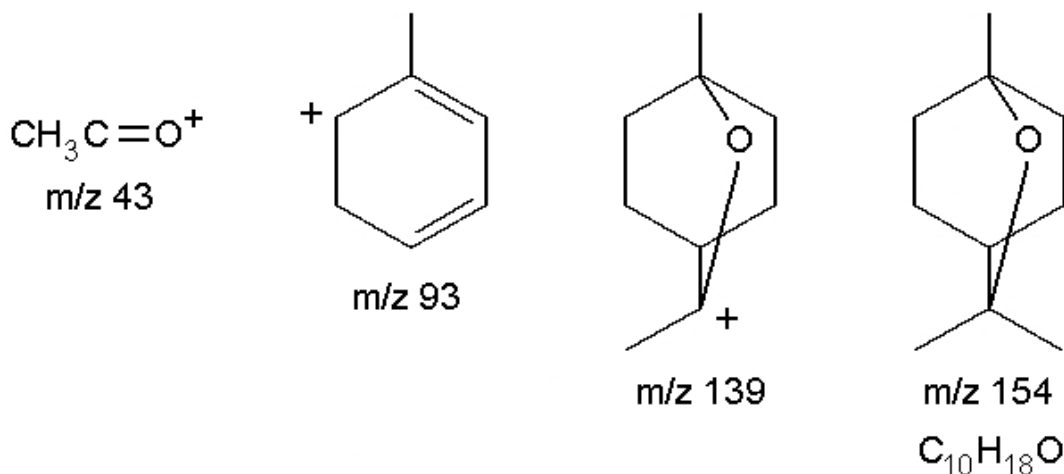


FIGURA 29 - PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO OBSERVADO PARA O COMPOSTO 1,8-CINEOL.

O espectro da Figura 27-D foi relacionado ao  **$\alpha$ -terpineol**, com pico do íon molecular  $m/z=154$ , confirmado como  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$  a sua fórmula molecular, de baixa intensidade, característico de álcoois terciários. Os picos  $m/z = 136$  [M-18] e  $m/z = 121$  [M-18-15] são característicos da perda de água e do grupo metila, respectivamente. Ainda na Figura 27-D, pode ser confirmada pelo arquivo da espectroteca NIST 2008 e por dados constantes na literatura (ADAMS, 2007), refere-se a álcoois terciários cíclicos, com picos de  $m/z$  iguais a 43, 71 e 93, característicos dessa classe de compostos.

O espectro de massas referente à Figura 27-E foi associado ao **acetato de  $\alpha$ -terpinila**, com pico do íon molecular  $m/z=196$  de baixa intensidade, confirmado a sua fórmula molecular como  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_2$ .



## 5.6 RENDIMENTO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS

Foram obtidos extratos de polaridades diferentes a partir das principais partes aéreas da planta em estudo: folhas, frutos e flores, com os rendimentos mostrados na Tabela 08. Totalizou-se 18 amostras de extratos, as quais foram destinadas para bioatividades. O extrato alcoólico a 70% das flores e o extrato de acetato de etila das folhas de *E. cinerea* foram os que mostraram um maior rendimento comparando com os outros extratos orgânicos.

TABELA 08 – RENDIMENTO (g) DOS EXTRATOS ORGÂNICOS OBTIDOS ATRAVÉS DE FOLHAS, FRUTOS E FLORES DE *E. cinerea*, PARTINDO DE 100 g DE CADA ÓRGÃO VEGETAL.

	<i>n</i> -hexano	dicloro- metano	acetato de etila	álcool absoluto	álcool 70%	álcool 50%
Folhas	8,3876	9,8432	13,4548	11,2038	11,9128	2,3269
Frutos	4,9362	0,8770	2,5206	11,0489	2,8790	1,7986
Flores	7,5752	6,0357	3,2787	5,7778	14,4542	2,6598

## 5.7 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DAS FOLHAS, FRUTOS E FLORES DE *E. cinerea*

As Tabelas 09 e 10 resumizam os resultados observados na análise fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos e dos extratos aquosos provenientes das folhas, frutos e flores de *E. cinerea*.

Encontrou-se resultado positivo para flavonoides, esteroides / triterpenoides, e taninos nos extratos hidroalcoólicos; e nos extratos aquosos positivo para glicosídeos saponínicos, taninos, aminogrupos, ácidos fixos e ácidos voláteis. Estes metabólitos secundários evidenciados nos extratos das folhas de *E. cinerea* confirmam com a pesquisa elaborada por Franco (2005).

De acordo com Costa (1986), é comum encontrar taninos, além de glicosídeos flavônicos nas espécies do gênero *Eucalyptus*. Determinou-se a positividade para esses metabólitos, na avaliação dos extratos hidroalcoólicos e aquosos das folhas, flores e frutos de *E. cinerea*, em concordância com os estudos anteriores relatados para *E. smithii* (FABROWSKI, 2002), *E. benthamii* Maiden et Cambage (BOSCARDIN, 2009), *E. globulus* spp *biscotata* (MALINOWSKI, 2010) e *E. badjensis* Beuzev. & Welch. (ANTÔNIO, 2011).

Os ensaios para a detecção de cumarinas, antraquinonas, assim com alcaloides, que são compostos nitrogenados e de extenso potencial farmacológico, demonstraram resultados negativos nas folhas, flores e frutos de *E. cinerea*. Certifica-se que estes compostos não são verificados na família Myrtaceae (SIMÕES *et al.*, 2003).

As informações obtidas através dos ensaios fitoquímicos com partes aéreas da espécie *E. cinerea* estão em conformidade com os principais grupos metabólitos observados no gênero *Eucalyptus*.

TABELA 09 – ANÁLISE DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS E/OU FRAÇÕES.

<b>Metabólitos secundários</b>	<b>Análise</b>	<b>Folhas</b>	<b>Frutos</b>	<b>Flores</b>
Alcaloides	Reativo de Mayer	-	-	-
	Reativo de Dragendorff	-	-	-
	Reativo de Bouchardat	-	-	-
	Reativo de Bertrand	-	-	-
Flavonoides	Leucoantocianidinas	++	++	++
	Heterosídeos flavônicos	++	++	++
	Reação oxalo-bórica	++	++	++
	Reação de Pacheco	++	++	++
	Reação de Zn em HCl	-	-	-
Cumarinas	Fluorescência produzida pelo ultravioleta	-	-	-
Antraquinonas	Reação de Bornträger	-	-	-
Esteroides/ triterpenoides	Reação de Liberman-Bouchard	+	+	+
Glicosídeos saponínicos	Ensaio da espuma	-	-	-
Taninos	Cloreto férrico	++	++	++
	Solução de gelatina a 2,5%	++	++	++
	Sulfato de ferro amoniacal	++	++	++
	Cloridrato de emetina	++	++	++
	Cianeto de potássio	++	++	++
	Ácido nítrico	++	++	++
	Dicromato de potássio	++	++	++
	Formol clorídrico:			
	Taninos hidrolisáveis	++	++	++
	Taninos condensados	++	++	++

- : negativo; + : positivo; ++ : fortemente positivo.

TABELA 10 – ANÁLISE DOS EXTRATOS AQUOSOS.

<b>Metabólitos secundários</b>	<b>Análise</b>	<b>Folhas</b>	<b>Frutos</b>	<b>Flores</b>
Glicosídeos antociânicos	Mudança de cor conforme o pH (ácido, neutro, alcalino)	-	-	-
Glicosídeos saponínicos	Ensaio da espuma	+	+	+
Glicosídeos cianogênicos	Reação de isopurpurato de sódio	-	-	-
Taninos	Cloreto férrico	++	++	++
	Solução de gelatina a 2,5%	++	++	++
	Sulfato de ferro amoniacal	++	++	++
	Cloridrato de emetina	++	++	++
	Cianeto de potássio	++	++	++
	Ácido nitroso	++	++	++
	Dicromato de potássio	++	++	++
	Formol clorídrico:			
	Taninos hidrolisáveis	++	++	++
	Taninos condensados	++	++	++
Aminogrupos	Revelador com ninhidrina	+	+	+
Ácidos fixos	Reativo de Nessler	+	+	+
Ácidos voláteis	Papel de tornassol	+	+	+

- : negativo; + : positivo; ++ : fortemente positivo.

## 5.8 FENÓIS TOTAIS

Os compostos fenólicos de plantas estão presentes em diversas classes como: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanas e ligninas. Muitos destes compostos de ocorrência natural apresentam importantes atividades biológicas, como a atividade antioxidante (SOUSA, 2007).

Os conteúdos de fenóis totais (média  $\pm$  desvio padrão), expressos em mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato, obtidos na curva analítica do padrão ácido gálico, foram de  $(556,23 \pm 9,23)$ ,  $(1493,36 \pm 85,79)$  e  $(550,19 \pm 3,49)$

para os extratos etanólicos de folhas, frutos e flores de *E. cinerea* respectivamente; e de  $(3234,61 \pm 144,26)$ ,  $(2505,06 \pm 87,47)$  e  $(1876,27 \pm 59,65)$  para os extratos acetônicos (Tabela 11). Pelo teste t de Student houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre amostras do mesmo órgão vegetal (comparação entre extrato etanólico e acetônico).

O menor teor de fenóis totais foi observado no extrato etanólico das flores de *E. cinerea* e o maior teor no extrato acetônico das folhas.

TABELA 11 – FENÓIS TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E ACETÔNICOS DAS PARTES AÉREAS DE *E. cinerea*.

Amostras	Fenóis totais	
	(mg de EAG/g de extrato etanólico 100%)	(mg de EAG/g de extrato acetônico 80%)
Folhas	$556,23 \pm 9,23^b$	$3234,61 \pm 144,26^a$
Frutos	$1493,36 \pm 85,79^b$	$2505,06 \pm 87,47^a$
Flores	$550,19 \pm 3,49^b$	$1876,27 \pm 59,65^a$

EAG = equivalente de ácido gálico. Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de três repetições. Para o mesmo órgão vegetal, resultados seguidos por letras distintas diferem estatisticamente pelo teste t de Student ( $p < 0,01$ ).

Nas pesquisas realizadas por Malinowski (2010) e por Antônio (2011), foi observado nas folhas de *E. globulus* ssp. *bicostata* e *E. badjensis* o conteúdo de fenóis totais em  $118,35 \pm 8,65$  mg de EAG/g de extrato e em  $654,36 \pm 21,62$  mg de EAG/g de extrato, respectivamente.

Os diferentes valores encontrados com os dados da literatura podem apresentar relação com vários fatores, como o método de extração, época da coleta, órgão vegetal, condições do solo, entre outros.

Os extratos avaliados de *E. cinerea* apresentam altos teores de compostos fenólicos, evidenciando a existência de uma possível ação antioxidante, o que viabiliza a continuidade do trabalho com esta espécie vegetal.

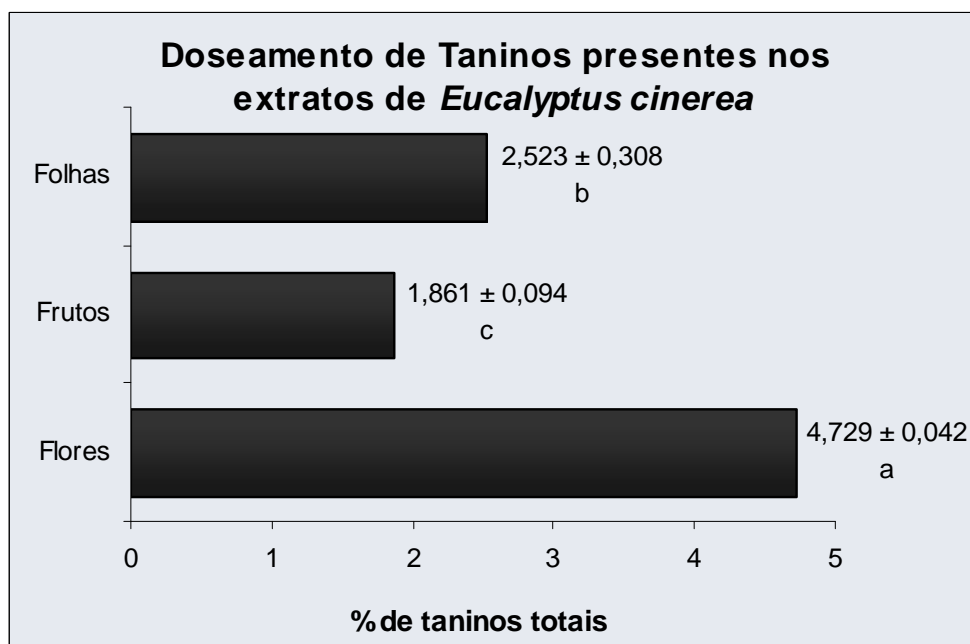
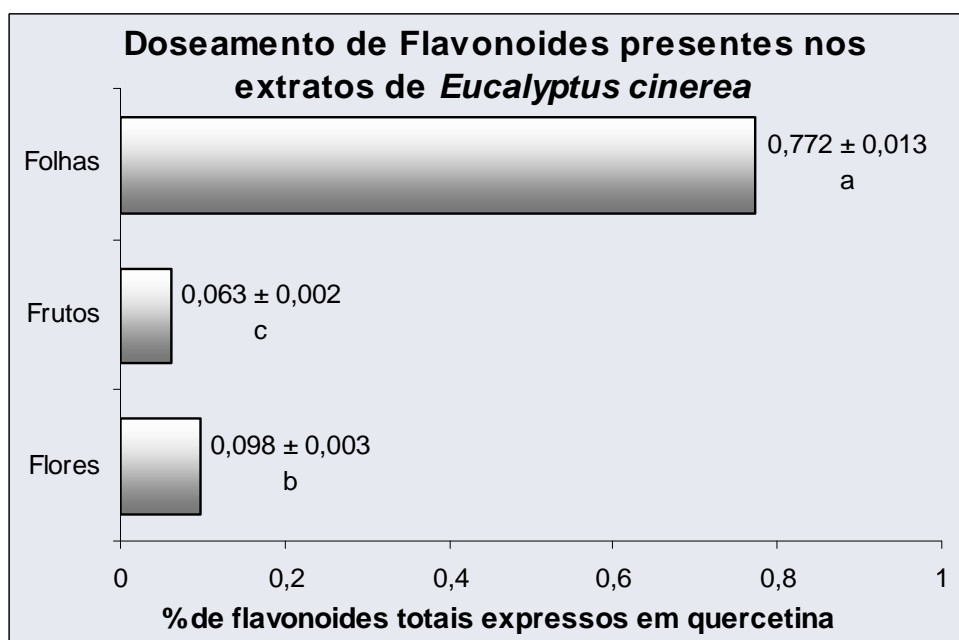
## 5.9 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES E TANINOS

Os resultados (média  $\pm$  desvio padrão) do teor de flavonoides em porcentagem expressos em quercetina para a espécie em estudo foram os

seguintes:  $(0,772 \pm 0,013)$  folhas;  $(0,098 \pm 0,003)$  flores e  $(0,063 \pm 0,002)$  frutos. Para o conteúdo de taninos totais as porcentagens obtidas foram:  $(2,523 \pm 0,308)$  folhas;  $(4,750 \pm 0,029)$  flores e  $(1,861 \pm 0,094)$  frutos (Figura 30).

Portanto, o teor de taninos obtidos para as flores foi significativamente superior aos demais órgãos vegetais de *E. cinerea*. No estudo realizado com *E. cloeziana* apresentou um grande potencial como fonte comercial de taninos na casca (TRUGILHO *et al.*, 2003).

E ao comparar os valores com outras plantas da família Myrtaceae, pode-se dizer que o doseamento das folhas de *E. cinerea* condiz com o esperado para flavonoides (FIUZA *et al.*, 2008; DONATINI *et al.*, 2009).



Resultados com letras distintas diferem estatisticamente entre si, segundo o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

FIGURA 30 – DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES E TANINOS TOTAIS PRESENTES NOS EXTRATOS DE FOLHAS, FRUTOS E FLORES DE *E. cinerea*.

## 5.10 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

### 5.10.1 Fração acetato de etila

Através do extrato bruto das folhas de *E. cinerea* obteve-se a fração semipurificada acetato de etila (FAE), a qual possui resultados espectrais de RMN -<sup>13</sup>C no estado sólido.

A Figura 31 mostra o espectro de RMN -<sup>13</sup>C, no estado sólido, da fração acetato de etila. A análise do espectro de RMN -<sup>13</sup>C foi baseada em Czochanska *et al.* (1980) e Navarrete *et al.* (2010). O espectro foi dividido em duas regiões, A e B. Os deslocamentos químicos de 30 a 90 ppm correspondem ao anel da região A, e entre 90 e 160 ppm ao anel da região B. A região entre 70 e 90 ppm é correspondente a estereoquímica do anel C (BEHRENS *et al.*, 2003).

Na região A observa-se uma banda larga em  $\delta$  40 ppm corresponde ao C-4 que pode ser referente à configuração *cis* ou *trans* (CZOCHANSKA *et al.*, 1980). Sinais em  $\delta$  56 ppm correspondem ao grupo metoxila (NEWMAN, PORTER, 1992), podendo ser em C-4' de unidades de proantocianidinas ou C-4'' do ácido gálico (MELLO, PETEREIT, NAHRSTEDT, 1996). Sinais em  $\delta$  122 e 140 ppm correspondem ao C-1'' e C-4'' do ácido gálico, respectivamente (MELLO, 1995).

Sinais em  $\delta$  65-66 ppm correspondem ao C-3 da unidade terminal de flavan-3-ol (CZOCHANSKA *et al.*, 1980). Em  $\delta$  75 ppm é observado uma banda larga que corresponde ao C-2 de unidades com configuração do tipo 2,3-*cis* de unidades de prodelfinidina (KOUPI-ABYAZANI *et al.*, 1993). Sinal em  $\delta$  92 ppm corresponde ao C-8 de flavonols (AGRAWAL, 1989).

O deslocamento químico em  $\delta$  110 ppm confirma a presença de unidades de prodelfinidinas e ausência de procianidinas, mostrando a presença de OH no C-3'. De acordo com Koupi-Abyazani *et al.* (1993) este sinal corresponde ao C-2' e C-6' de prodelfinidinas, e Mello (1995) afirma a ausência de substituição destes carbonos no anel B, confirmando a triidroxilação do anel (KOUPI-ABYAZANI *et al.*, 1993).

Sinal em  $\delta$  105 ppm indica C-4 e C-8 com ligação do tipo 4→8, e talvez uma pequena contribuição de C-6 em ligações 4→6 de procianidina e prodelfinidina. A ausência de sinal em  $\delta$  95 ppm e presença de sinal em  $\delta$  105 ppm, indicam a predominância de ligação interflavonoides com ligação do tipo 4→8, classificação padrão de procianidinas (OO, KASSIM, PIZZI, 2009). Sinais entre  $\delta$  102-107 ppm



indicam a presença de hidroxilas nas posições C-3', C-4' e C-5' do anel B (KOUPI-ABYAZANI *et al.*, 1993). Em  $\delta$  86 ppm corresponde a ligação glicosídica da glucose em C4, que se apresenta na Figura 31, porém com baixa intensidade, sugerindo este tipo de ligação (WAWER, WOLNIAK, PARADOWSKA, 2006).

Sinais em  $\delta$  116 ppm representam C-5' de unidades interflavonoídicas do tipo 4 $\rightarrow$ 8, e para ligações 4 $\rightarrow$ 6 o sinal encontra-se em  $\delta$  105 ppm (NAVARRETE *et al.*, 2010).

Sinal em  $\delta$  120 ppm indica C-6' de unidade de catequina. Em  $\delta$  130 ppm caracteriza C-1' de procianidina,  $\delta$  139 ppm C-4'' do ácido gálico e  $\delta$  144 ppm caracteriza C-3' e C-4'-OH do anel B (WAWER, WOLNIAK, PARADOWSKA, 2006). Sinal em  $\delta$  97 ppm encontram-se C6, C8 e C10 de procianidinas (WAWER, WOLNIAK, PARADOWSKA, 2006). Em  $\delta$  157 ppm corresponde ao C-5 e C-7 com grupamento OH de flavonoides e taninos condensados, referente ao anel A, (NAVARRETE *et al.*, 2010). Sinal entre 160-180 ppm indica a presença do grupamento C=O na posição do C-4 de flavonóis (AGRAWAL, 1989).

Pode-se concluir que, a fração acetato de etila é composta por unidades de flavan-3-óis (I), sugerindo que a mesma seja composta de proantocianidinas (II), além da presença de unidade de ácido gálico (III).

As estruturas químicas (I), (II) e (III) sugeridas estão representadas na Figura 32.

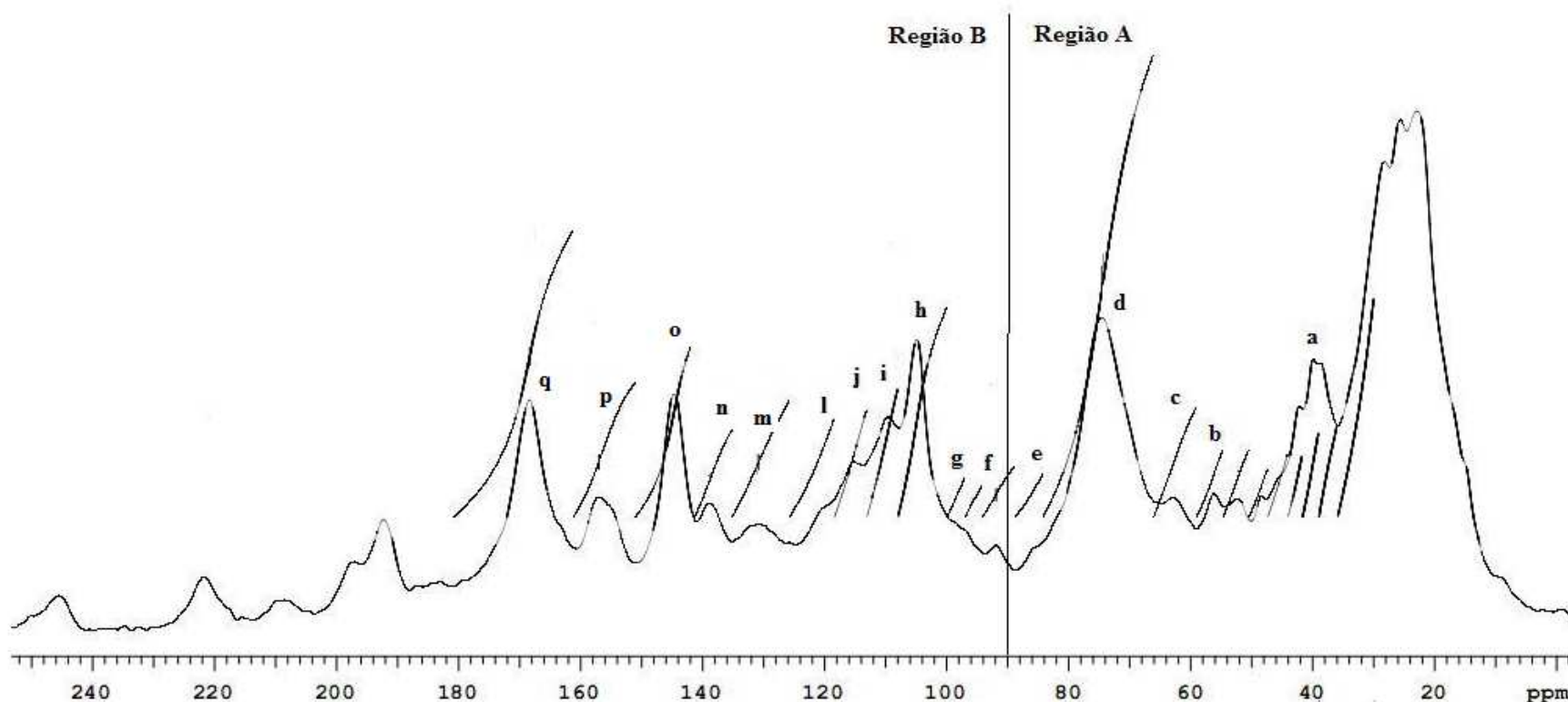
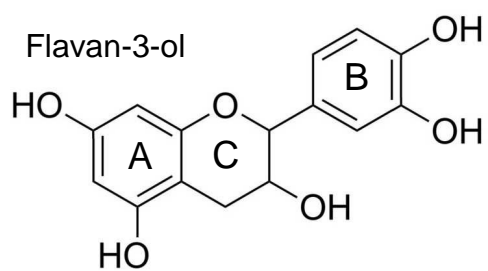
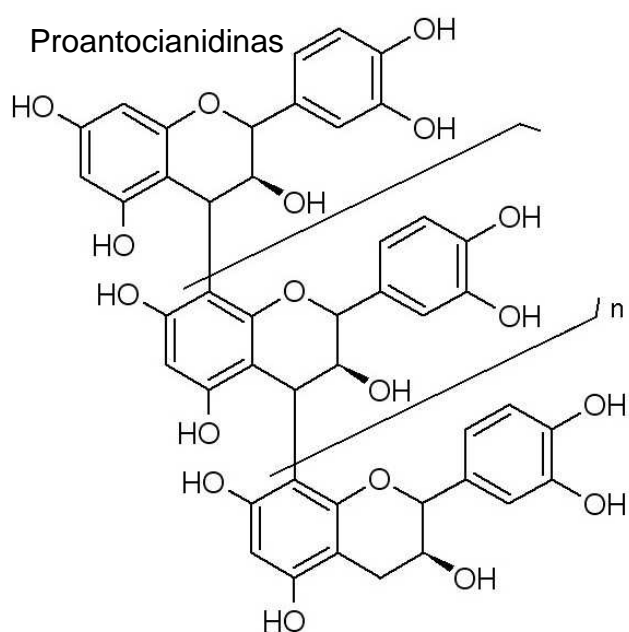


FIGURA 31 – ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  NO ESTADO SÓLIDO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.

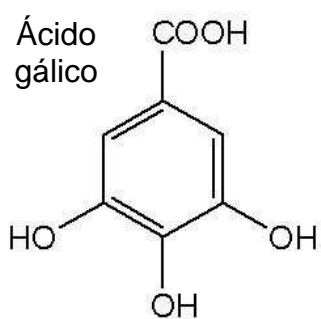
a) C-4 de unidades de prodelfinidina e prorobinetinidina; b) metoxila de ácido carboxílico; c) C-3 unidade terminal de flavan-3-ol; d) C-2 de unidades de prodelfinidina (configuração 2,3-*cis*); e) glucose em C-4; f) C-8 de unidade de flavonol; g) C6 e C8 de procianidinas; h) C-3', C-4' e C-5'-OH do anel B; i) C-2' e C-6' de unidades do anel B não substituídas de prodelfinidinas; j) C-5' de interflavonoides; l) C-6' de unidade de catequina; m) C-1' de unidade de procianidina; n) C-4'' do ácido gálico; o) C-3' e C-4'-OH do anel B; p) C-5 e C-7-OH de unidade de flavonoides e taninos condensados; q) C=O na posição C-4 de flavonóis.



(I)



(II)



(III)

FIGURA 32 – REPRESENTAÇÃO DE ESTRUTURAS QUÍMICAS.

### 5.10.2 Substância F1-2#10: *ent*-catequina

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da F1-2#10 (Figura 33) mostra para os hidrogênios alifáticos H-4<sub>ax</sub>(C) e H-4<sub>eq</sub>(C) deslocamentos de  $\delta$  2,49 e 2,84 ppm, respectivamente, e constantes de acoplamento de 16,2 Hz. O hidrogênio alifático H-3(C) se correlaciona com os hidrogênios H-4<sub>ax</sub>(C) e H-4<sub>eq</sub>(C) apresentando constantes de acoplamento com valor de 8,1 e de 5,4 Hz, respectivamente, indicando uma configuração relativa 3,4<sub>ax</sub>-*trans* e 3,4<sub>eq</sub>-*cis*. Para os hidrogênios alifáticos H-3(C) e H-2(C) o espectro mostra deslocamentos de  $\delta$  3,96 e 4,55 ppm, respectivamente e uma constante de acoplamento  $J_{\text{H-2-H-3}}$  de 7,5 Hz comprovando uma configuração relativa do tipo 2,3-*trans* (USHIROBIRA *et al.*, 2007). Portanto, observa-se uma configuração relativa para a substância isolada em F1-2#10 do tipo 2,3-*trans*, 3,4<sub>ax</sub>-*trans* e 3,4<sub>eq</sub>-*cis*.

Em  $\delta$  6,83, 6,76 e 6,71 ppm aparecem sinais característicos de um sistema AMX correspondendo aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' com constantes de acoplamento de  $J_{\text{H-6'-H-5'}}=8,1$ ,  $J_{\text{H-5'-H-6'}}=8,1$  e  $J_{\text{H-2'-H-6'}}=1,8$ , respectivamente, comprovando a diidroxilação no anel B. Nesse espectro observam-se também, os hidrogênios H-6(A) e H-8(A) em  $\delta$  5,84 e 5,92 ppm. Os dados de deslocamento ( $\delta$  em ppm), multiplicidade e constante de acoplamento ( $J$  em Hz) podem ser observadas na Tabela 12. O espectro de RMN 2D (COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$ ) (Figura 34) mostra as correlações dos hidrogênios aromáticos e alifáticos facilitando a interpretação e elucidação estrutural da substância F1-2#10.

TABELA 12 – DESLOCAMENTO DA SUBSTÂNCIA F1-2#10 (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD RELATIVO PARA TMS).

Próton	$\delta$ (ppm)	* $\delta$ Literatura (ppm)	Multiplicidade	$J$ (Hz)
H-4ax (C)	2,49	2,49	<i>dd</i>	$J_{H-4ax-H-4eq} = 16,2$ $J_{H-4ax-H-3} = 8,1$
H-4eq (C)	2,84	2,83	<i>dd</i>	$J_{H-4ax-H-4eq} = 16,2$ $J_{H-4eq-H-3} = 5,4$
H-2 (C)	4,55	4,55	<i>s</i>	$J_{H-2-H-3} = 7,5$
H-3 (C)	3,96	3,96	<i>ddd</i>	$J_{H-3-H-2} = 7,5$ $J_{H-3-H-4eq} = 5,4$ $J_{H-3-H-4ax} = 8,1$
H-6 (A)	5,84	5,85	<i>d</i>	$J_{H-6-H-8} = 2,4$
H-8 (A)	5,92	5,92	<i>d</i>	$J_{H-8-H-6} = 2,4$
H-6' (B)	6,71	6,71	<i>dd</i>	$J_{H-6'-H-5'} = 8,1$ $J_{H-6'-H-2'} = 1,8$
H-5' (B)	6,76	6,76	<i>d</i>	$J_{H-5'-H-6'} = 8,1$
H-2' (B)	6,83	6,84	<i>d</i>	$J_{H-2'-H-6'} = 1,8$

\*USHIROBIRA *et al.*, (2007) dados em CD<sub>3</sub>OD; *s* = simpleto; *d* = duplete; *dd* = duplo duplete; *ddd* = duplo duplo duplete.

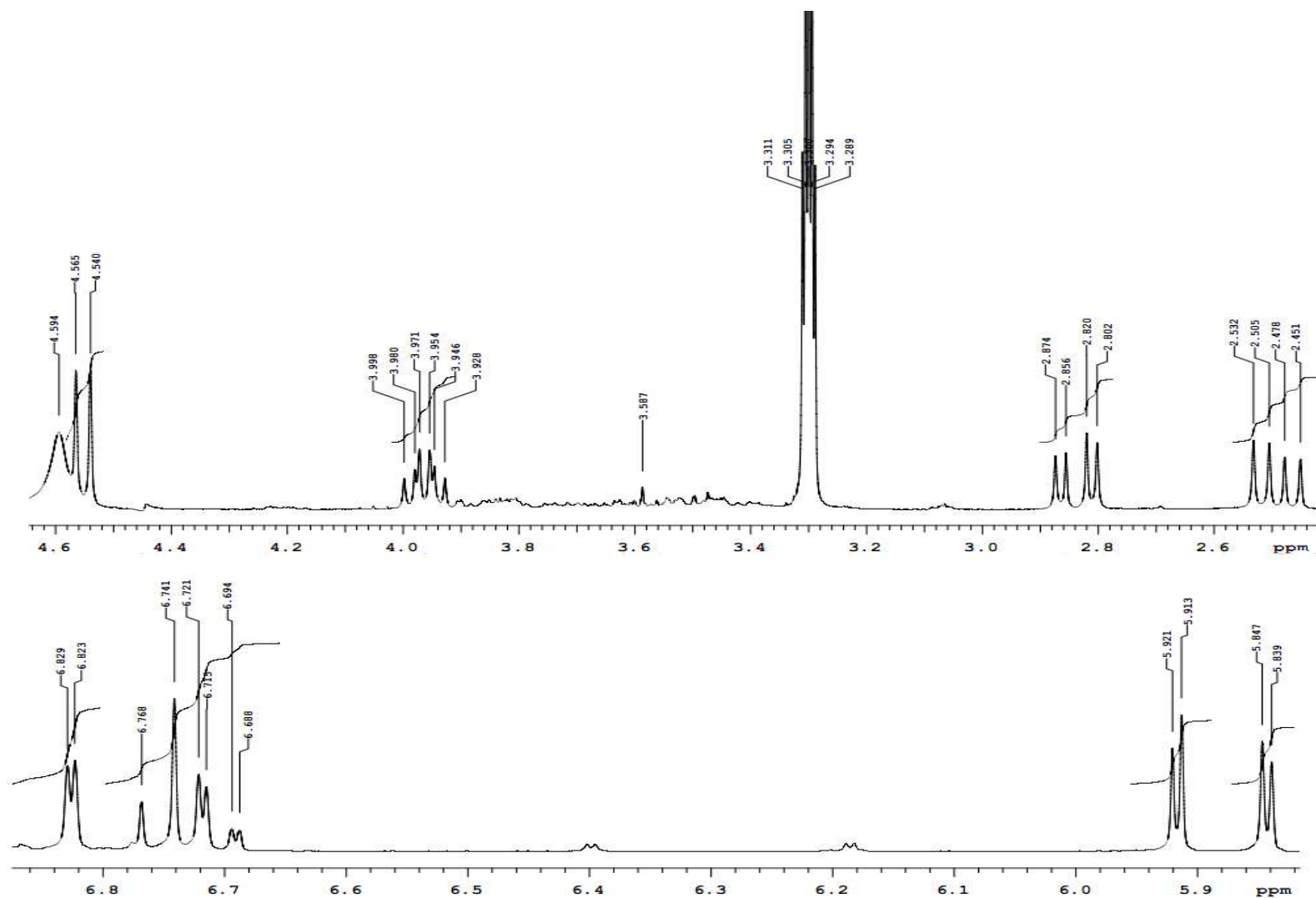


FIGURA 33 – ESPECTRO DE RMN - $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA F1-2#10 (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; RELATIVO PARA TMS).

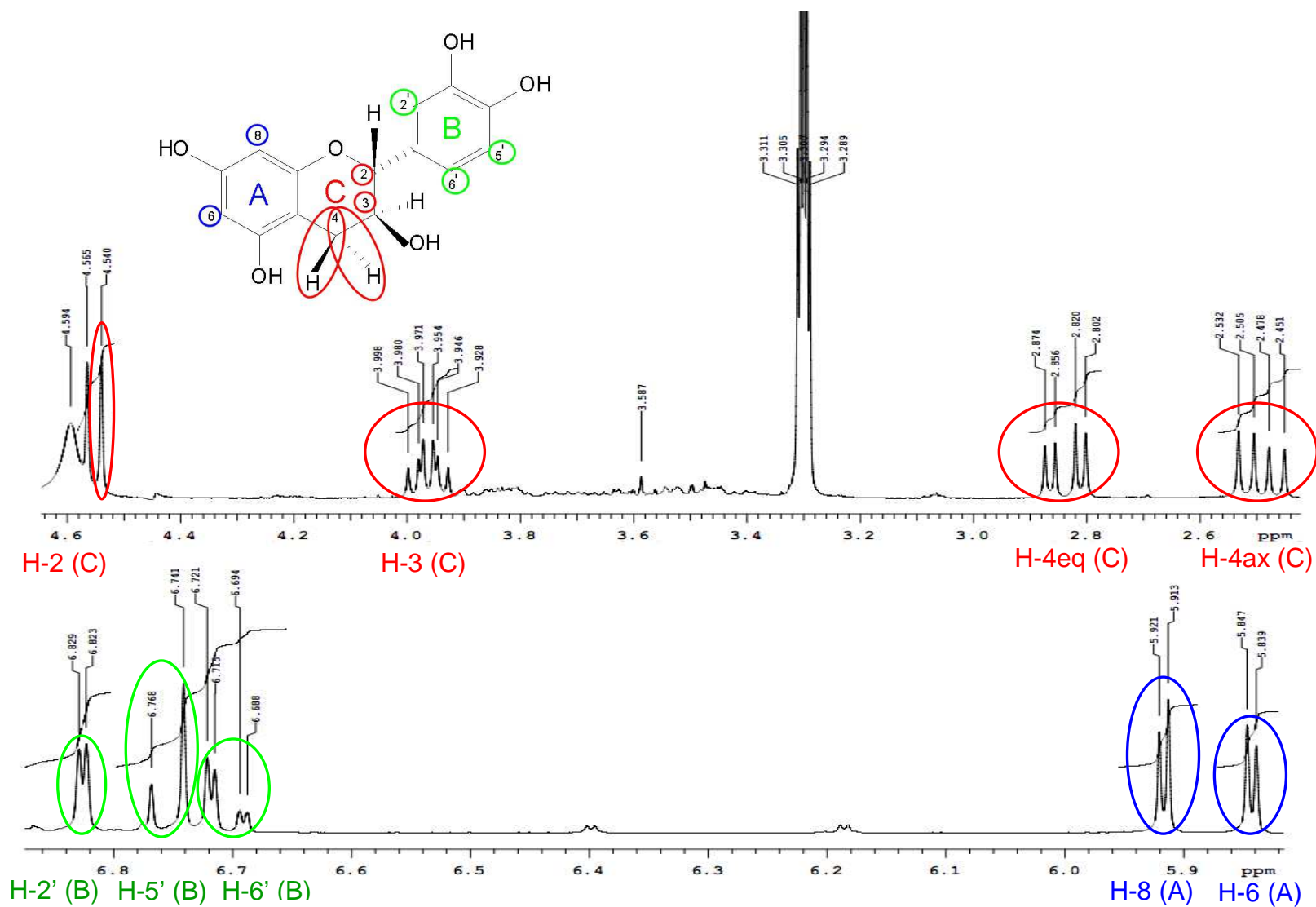


FIGURA 33 – ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DA SUBSTÂNCIA F1-2#10 (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; RELATIVO PARA TMS).

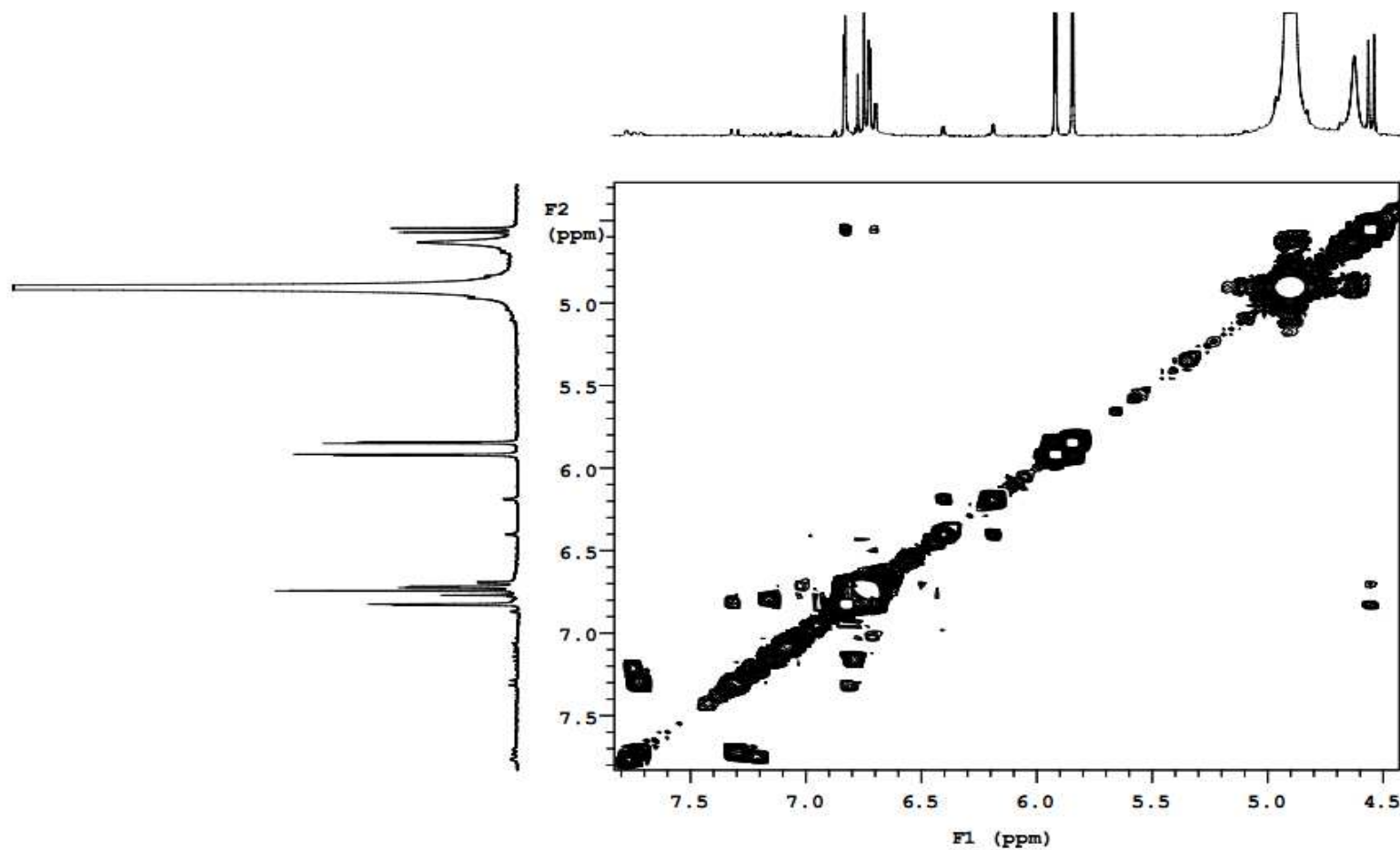


FIGURA 34 - ESPECTRO COSY (<sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H) DA SUBSTÂNCIA F1-2#10 (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD; RELATIVO PARA TMS).



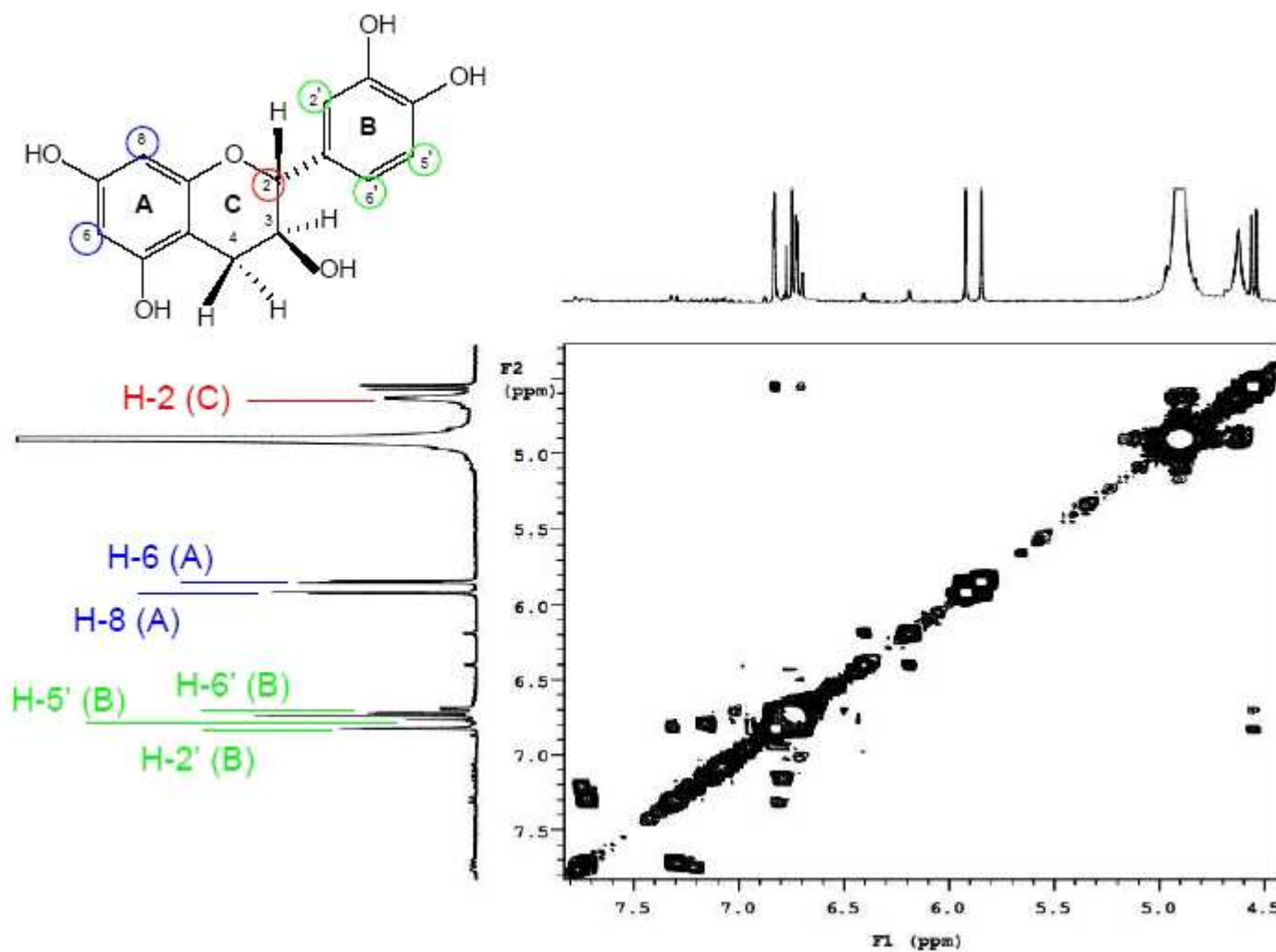


FIGURA 34 - ESPECTRO COSY ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ ) DA SUBSTÂNCIA F1-2#10 (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; RELATIVO PARA TMS).

Pela análise de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância isolada obtiveram-se os mesmos resultados discutidos por Cren-Olivé *et al.* (2002) (Tabela 13 e Figura 35). Assim pode-se afirmar que a substância F1-2#10 trata-se de um tipo de catequina (Figura 36).

TABELA 13 – RMN  $^{13}\text{C}$  COMPARATIVA DA AMOSTRA ( $\delta 1$ ) E OBTIDO POR CREN-OLIVÉ *et al.* (2002) ( $\delta 2$ ).

Carbono	$\delta 1$	$\delta 2$
2	82,9	83,0
3	68,8	68,9
4	28,5	28,6
5	157,6	157,7
6	96,3	96,4
7	157,8	157,9
8	96,3	96,6
9	156,9	157,0
10	100,8	100,9
1'	132,2	132,3
2'	115,2	115,4
3'	146,3	146,4
4'	146,2	146,3
5'	116,1	116,2
6'	120,0	120,2

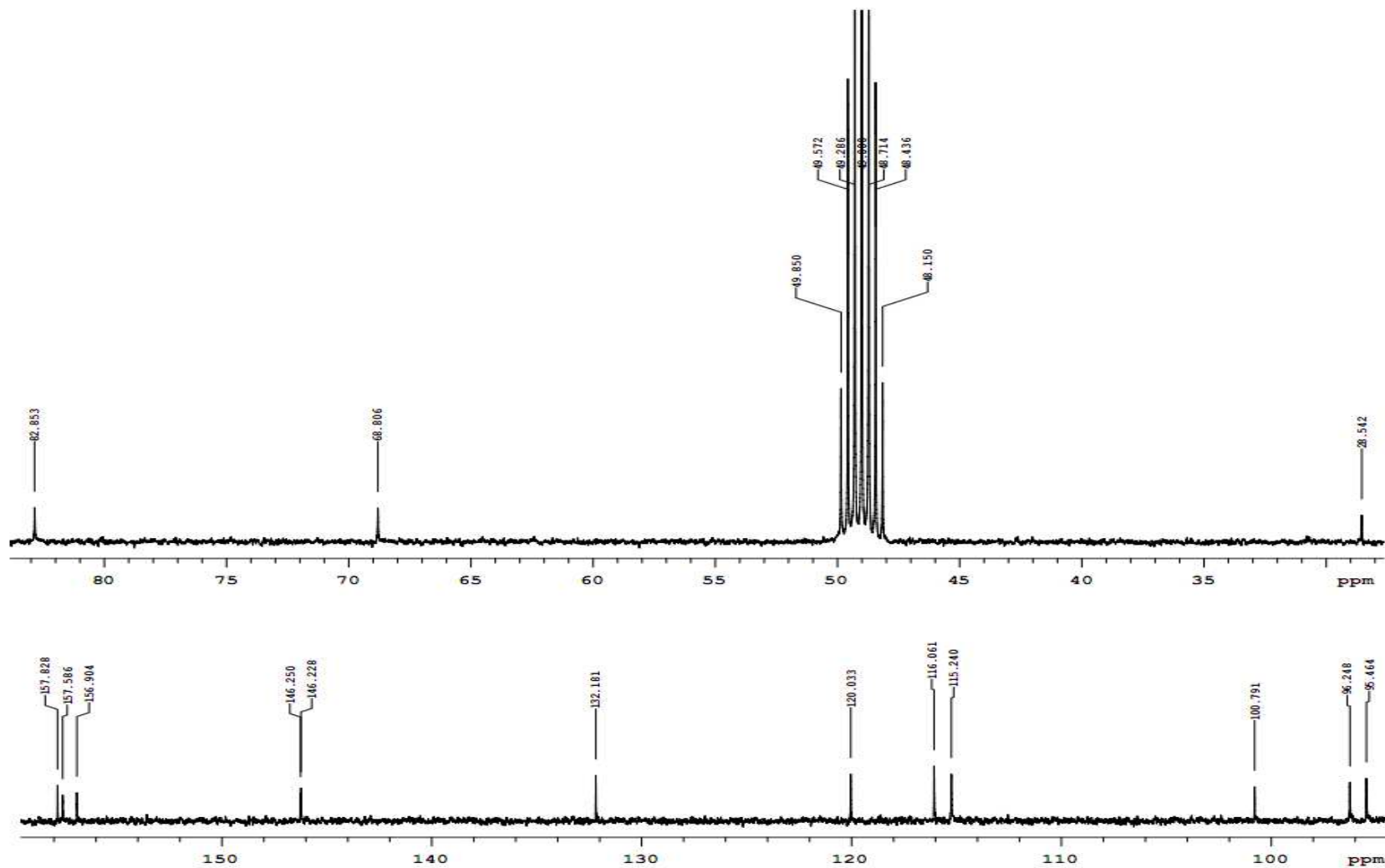


FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN - $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA F1-2#10 (75 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$  RELATIVO AO TMS).

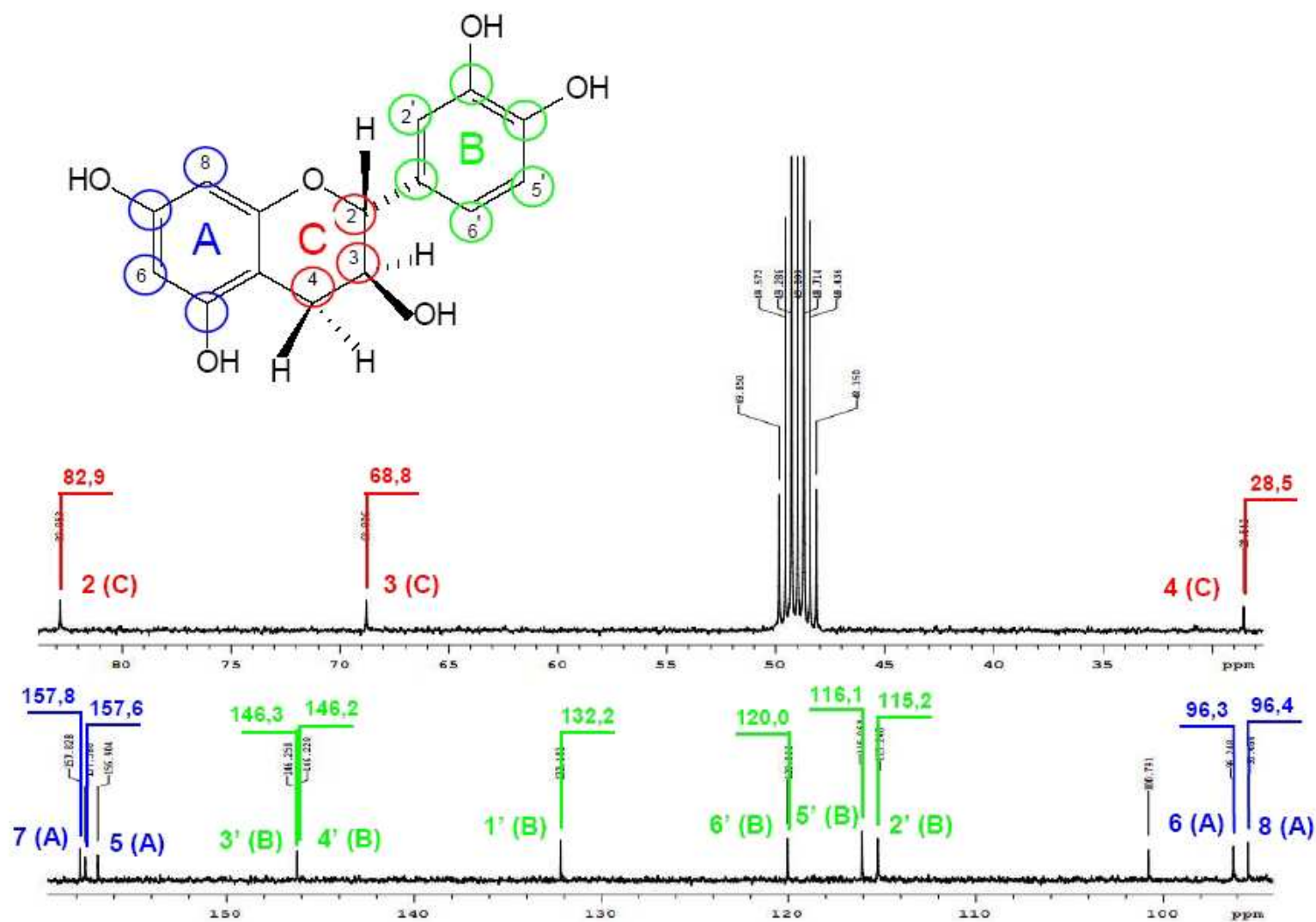


FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DA SUBSTÂNCIA F1-2#10 (75 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$  RELATIVO AO TMS).

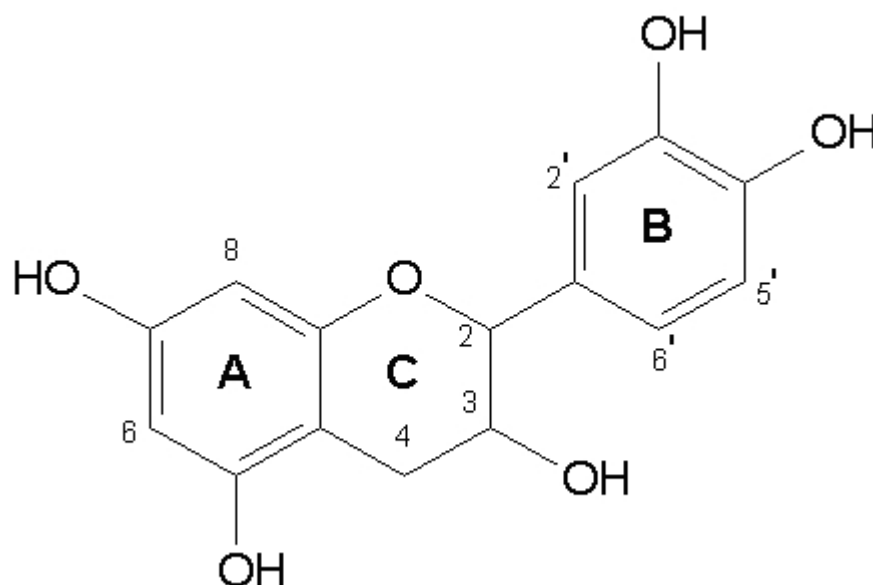


FIGURA 36 - REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA CATEQUINA.

Os derivados de catequinas possuem dois cromóforos aromáticos: os anéis benzênicos A e B, com bandas de absorção em torno de 280 nm (chamada de transição  $L_b$ ) e 240 nm (transição  $L_a$ ). Na literatura de dicroísmo circular indica que as configurações 2-(*R*) e 2-(*S*) originam Efeito Cotton negativo e positivo, respectivamente, para o cromóforo A (transição  $L_b$ ). Para o cromóforo B (transição  $L_a$ ), um Efeito Cotton positivo caracteriza configuração 3-(*R*) e um Efeito Cotton negativo para a configuração 3-(*S*) (KORVER, WILKINS, 1971 apud RODRIGUES, 2011; SLADE, FERREIRA, MARAIS, 2005). Assim, através da Figura 37, tem-se que a catequina é 2-(*S*),3-(*R*), por possuir Efeito Cotton positivo no cromóforo A e um Efeito Cotton negativo no cromóforo B.

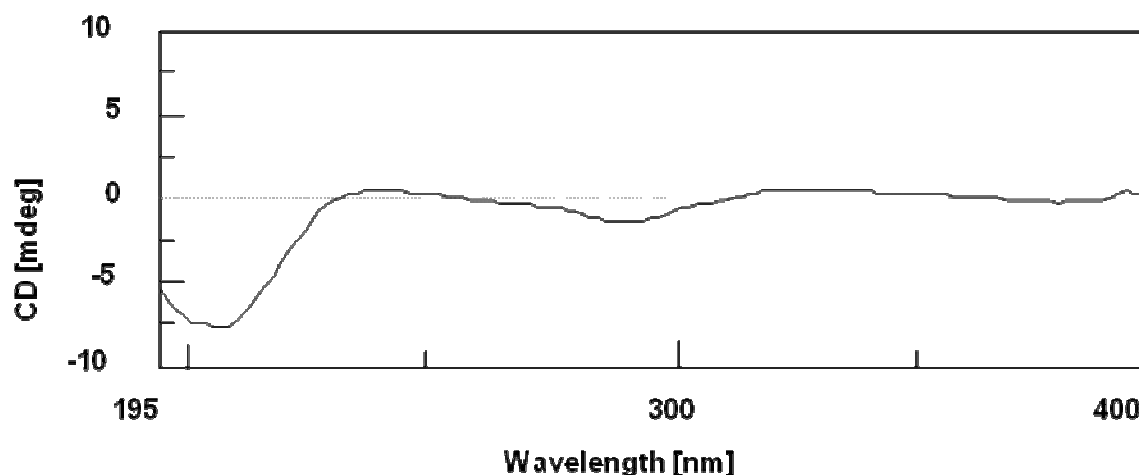


FIGURA 37 - ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR DA SUBSTÂNCIA F1-2#10.

A estereoquímica absoluta da substância F1-2#10 foi realizada com auxílio da rotação ótica específica obtendo-se o valor  $\alpha = -0,003$  de  $[\alpha]_D^{20} = -4,69^\circ$  (metanol;  $c = 0,64$ ).

Dessa forma, a substância F1-2#10 pode ser determinada como sendo **ent-catequina** ou **(-)-catequina** (Figura 38) descrita pela primeira vez no gênero e na espécie *E. cinerea*.

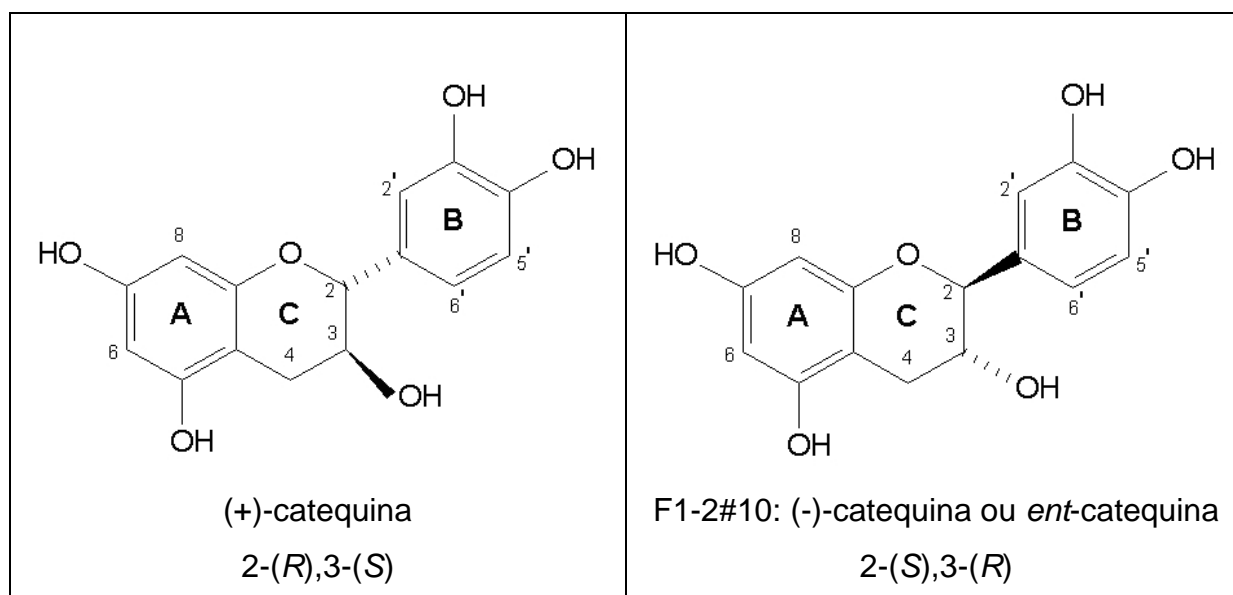


FIGURA 38 - ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA ISOLADA F1-2#10 DAS FOLHAS DE *E. cinerea*: ENT-CATEQUINA, EM COMPARAÇÃO COM A (+)-CATEQUINA.

O isômero mais comum da catequina é (+)-catequina. O outro estereoisômero (-)-catequina ou *ent*-catequina é mais raro de ser encontrado.

Estudo realizado com *Eucalyptus perriniana* revelou a biotransformação de (+)-catequina por células cultivadas desta espécie (OTANI *et al.*, 2004).

Em outras pesquisas, observam-se os efeitos estereoespecíficos de (+)- e (-)-catequina (NYFELER *et al.*, 1983). Cada isômero contribui para propriedades distintas, podendo-se retratar que a (+)-catequina possui atividade antibacteriana e a (-)-catequina possui um efeito maior de ação herbicida (BAIS *et al.*, 2002).

#### 5.11 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO

A avaliação da atividade antioxidante da espécie em estudo, a qual possui compostos fenólicos como os flavonoides e taninos, apresentou ação antioxidante para os três órgãos vegetais. Os potenciais antioxidantes dos extratos aquosos nas concentrações de 100, 200, 300 e 400 µg/mL foram respectivamente em percentagem de (18,47 ± 0,59), (20,53 ± 0,39), (21,43 ± 0,55), (15,23 ± 0,55) para folhas; (20,15 ± 1,05), (24,62 ± 1,06), (15,56 ± 0,86), (13,48 ± 0,31) para frutos; e (19,03 ± 0,67), (9,29 ± 0,61), (13,09 ± 0,30), (15,00 ± 0,21) para flores, utilizando o ácido ascórbico e a rutina como substâncias padrões (Tabela 14).

Para efeito de cálculo o ácido ascórbico foi considerado 100% de atividade antioxidante. Os resultados obtidos revelam que nenhuma amostra analisada apresentou capacidade maior que a do ácido ascórbico no complexo fosfomolibdênio.

A estatística feita pelo teste de análise de variância – ANOVA, efetuou a comparação entre as amostras e as concentrações, indica que os extratos aquosos de *E. cinerea* possuem ação antioxidante, mostrou-se para o extrato dos frutos na concentração de 200 µg/mL, para folhas na concentração de 200 e 300 µg/mL e para flores em 100 µg/mL.

TABELA 14 – AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNIO.

Atividade antioxidante (% ± DP)					
Concentrações (µg/mL)	Extratos aquosos liofilizados			Rutina	Ácido ascórbico
	Folhas	Frutos	Flores		
100	18,74 ± 0,59 <sup>b</sup>	20,15 ± 1,05 <sup>b</sup>	19,03 ± 0,67 <sup>a</sup>	33,61 ± 1,42	100
200	20,53 ± 0,39 <sup>a</sup>	24,62 ± 1,06 <sup>a</sup>	9,29 ± 0,61 <sup>d</sup>	33,91 ± 1,79	100
300	21,43 ± 0,55 <sup>a</sup>	15,56 ± 0,86 <sup>c</sup>	13,09 ± 0,30 <sup>c</sup>	34,32 ± 0,60	100
400	15,23 ± 0,55 <sup>c</sup>	13,48 ± 0,31 <sup>c</sup>	15,00 ± 0,21 <sup>b</sup>	36,08 ± 1,55	100

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo teste de Tukey (p < 0,01).

No estudo realizado por Malinowski (2010), o extrato alcoólico e hidroalcoólico a 70% de folhas de *E. globulus* ssp. *bicostata* demonstrou 23,27% e 24,17% de atividade antioxidante relativa ao ácido ascórbico, na redução do complexo fosfomolibdênio. Antônio (2011), relatou para folhas de *E. badjensis*, sob as mesmas condições experimentais, 31,98% de atividade antioxidante para o extrato aquoso, 20,46% para o extrato alcoólico, 38,26% para o extrato acetato de etila, 26,79% para o extrato diclorometano e 39,70% de ação antioxidante para o extrato hexano.

#### 5.12 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DO DPPH

A equação da curva analítica do DPPH foi  $y = 36,4499x - 0,1240$ , onde y corresponde à concentração de DPPH no meio, x é a absorvância média em 515 nm e o coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9992$ , ilustrado na Figura 39.



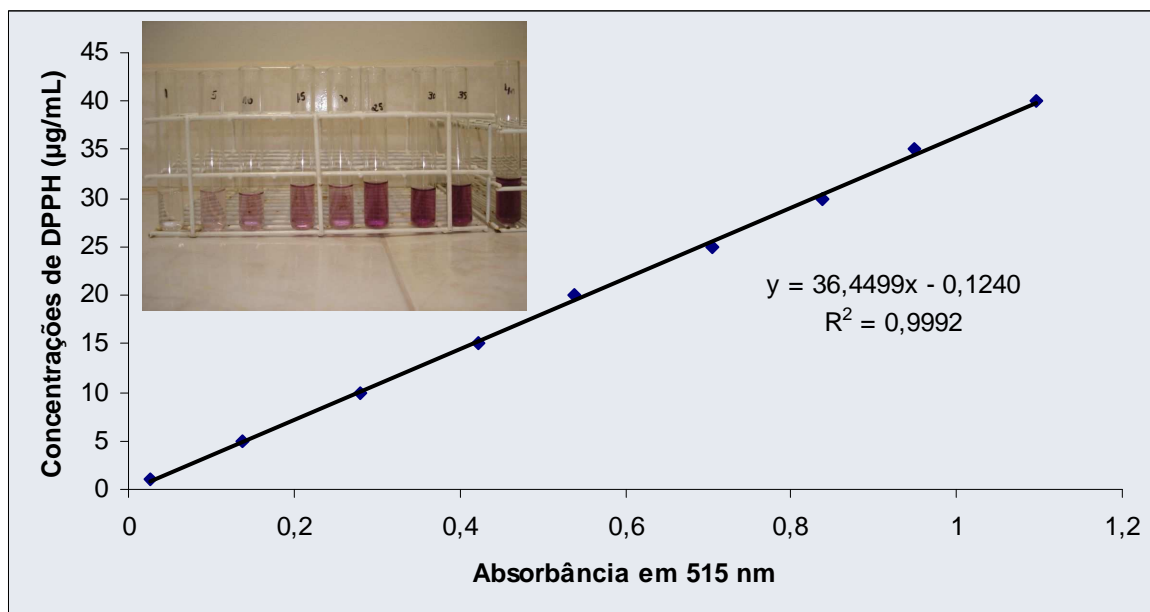


FIGURA 39 - CURVA ANALÍTICA DO DPPH.

Os dados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante (%AA) (Tabela 15) dos extratos etanólicos, da FAE de *E. cinerea* e dos controles (rutina e ácido gálico), analisados pelo teste do DPPH, estão apresentados nas Figuras 40 e 41. A análise estatística mostra que a espécie em estudo possui atividade sequestradora do radical DPPH, sendo que na concentração de 100 µg/mL o extrato das folhas resultou em  $(62,09 \pm 0,73\%)$  e o extrato das flores resultou  $(70,92 \pm 0,54\%)$ , valores significativamente superiores ao da rutina  $(48,51 \pm 1,55\%)$ , porém significativamente inferiores ao resultado do ácido gálico  $(93,70 \pm 0,07\%)$ . Destaque para a FAE, que na concentração de 100 µg/mL apresentou  $(95,18 \pm 0,04\%)$  de atividade antioxidante, valor significativamente semelhante ao do controle ácido gálico.

Sendo que tais compostos fenólicos podem apresentar excelente atividade antioxidante (MOREIRA *et al.*, 2005). Deve-se considerar que a rutina que é um composto do grupo dos flavonoides, e o ácido gálico um derivado de taninos, ambos com ação antioxidante muito bem reconhecida (SIMÕES *et al.*, 2003). Portanto, pode-se atentar que os resultados exibidos pelas amostras de *E. cinerea* são relevantes.

TABELA 15 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO DPPH.

Concentrações	%AA (média ± desvio padrão)					
	<i>E. cinerea</i> (folhas)	<i>E. cinerea</i> (frutos)	<i>E. cinerea</i> (flores)	Fração acetato de etila - FAE	Rutina	Ácido gálico
25 µg/mL	24,44 ± 0,83 <sup>c</sup>	19,29 ± 0,00 <sup>d</sup>	18,19 ± 0,00 <sup>d</sup>	39,64 ± 1,06 <sup>b</sup>	18,47 ± 0,31 <sup>d</sup>	83,04 ± 1,14 <sup>a</sup>
50 µg/mL	37,00 ± 1,27 <sup>c</sup>	27,07 ± 0,72 <sup>d</sup>	34,44 ± 2,86 <sup>c</sup>	62,93 ± 0,04 <sup>b</sup>	28,62 ± 0,46 <sup>d</sup>	93,07 ± 0,19 <sup>a</sup>
100 µg/mL	62,09 ± 0,73 <sup>c</sup>	46,70 ± 1,90 <sup>d</sup>	70,92 ± 0,54 <sup>b</sup>	95,18 ± 0,04 <sup>a</sup>	48,51 ± 1,55 <sup>d</sup>	93,70 ± 0,07 <sup>a</sup>

Para cada concentração, valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo método de Tukey ( $p < 0,05$ ).

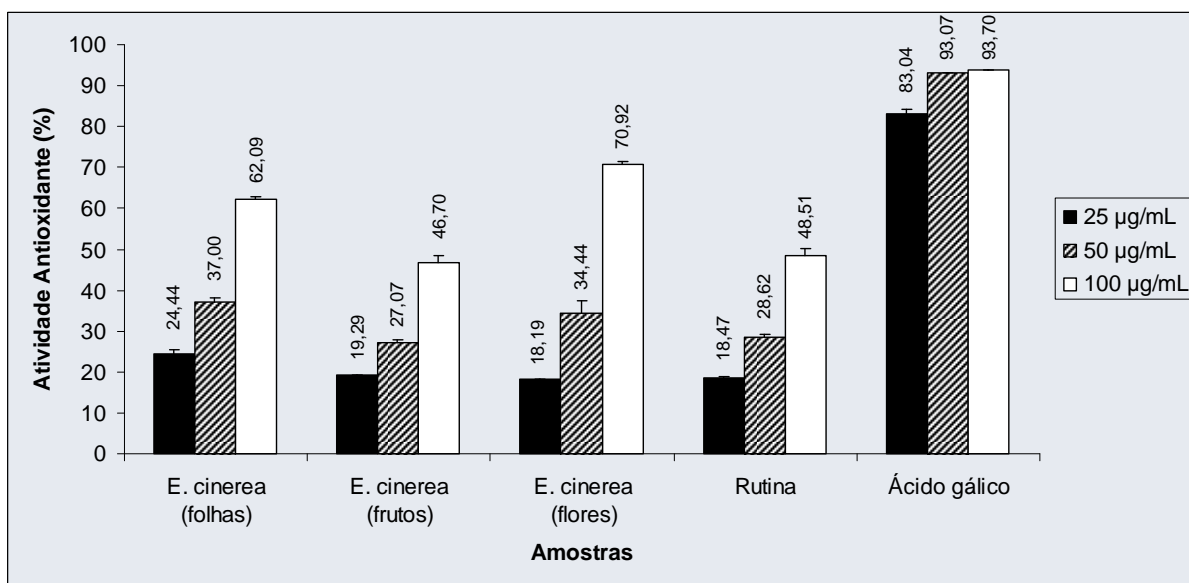


FIGURA 40 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE *E. cinerea* (FOLHAS, FRUTOS, FLORES) E DOS CONTROLES, NAS CONCENTRAÇÕES DE 25, 50, 100 µg/mL, ATRAVÉS DO MÉTODO DPPH.

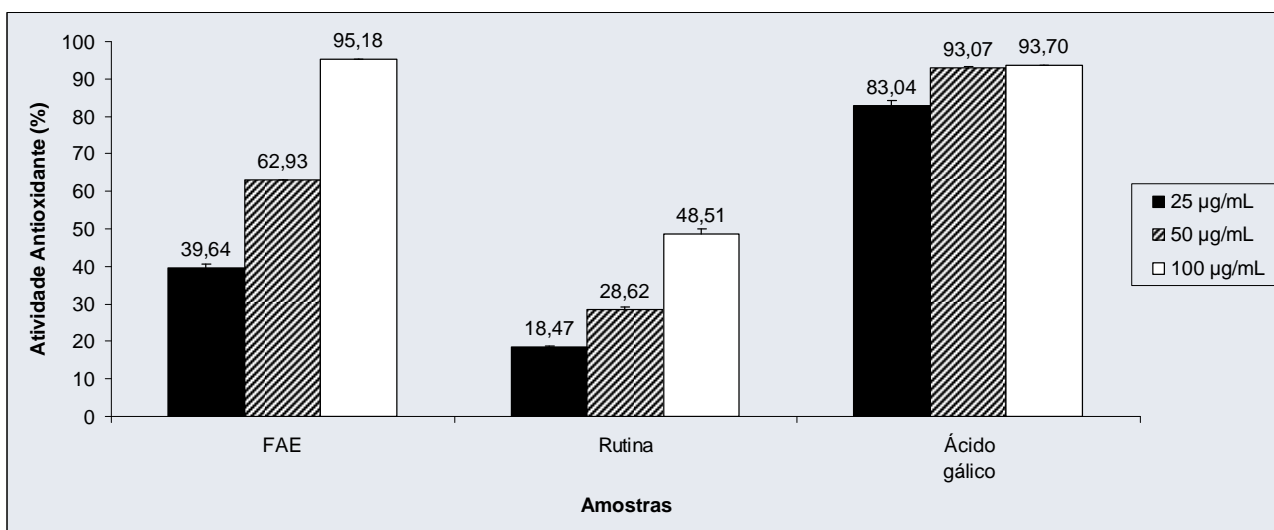


FIGURA 41 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FAE DE *E. cinerea* E DOS CONTROLES, NAS CONCENTRAÇÕES DE 25, 50, 100 µg/mL, ATRAVÉS DO MÉTODO DPPH.

A quantidade de amostra testada necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%,  $CE_{50}$  (Tabela 16), resultou para *E. cinerea* as  $CE_{50} = 80,27$   $\mu\text{g/mL}$  (folhas); 69,22  $\mu\text{g/mL}$  (flores); 105,99  $\mu\text{g/mL}$  (frutos); 35,49  $\mu\text{g/mL}$  (FAE), comparando aos controles positivos rutina ( $CE_{50} = 105,18$   $\mu\text{g/mL}$ ) e ácido gálico ( $CE_{50} = 7,80$   $\mu\text{g/mL}$ ). Logo, as amostras que apresentaram melhores resultados para  $CE_{50}$ , com valores significativos ao controle – rutina – foi primeiramente a FAE, seguida dos extratos etanólicos das flores e folhas.

TABELA 16 –  $CE_{50}$  DOS EXTRATOS E DA FAE DE *E. cinerea* NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH.

	Amostras	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Extratos de <i>E. cinerea</i>	Folhas	80,27
	Flores	69,22
	Frutos	105,99
Fração semipurificada	FAE	35,49
Controles	Rutina	105, 18
	Ácido gálico	7, 80

Para encontrar o  $CE_{50}$  das amostras efetuou-se o cálculo através da equação da reta, conforme Figuras 42 a 47.

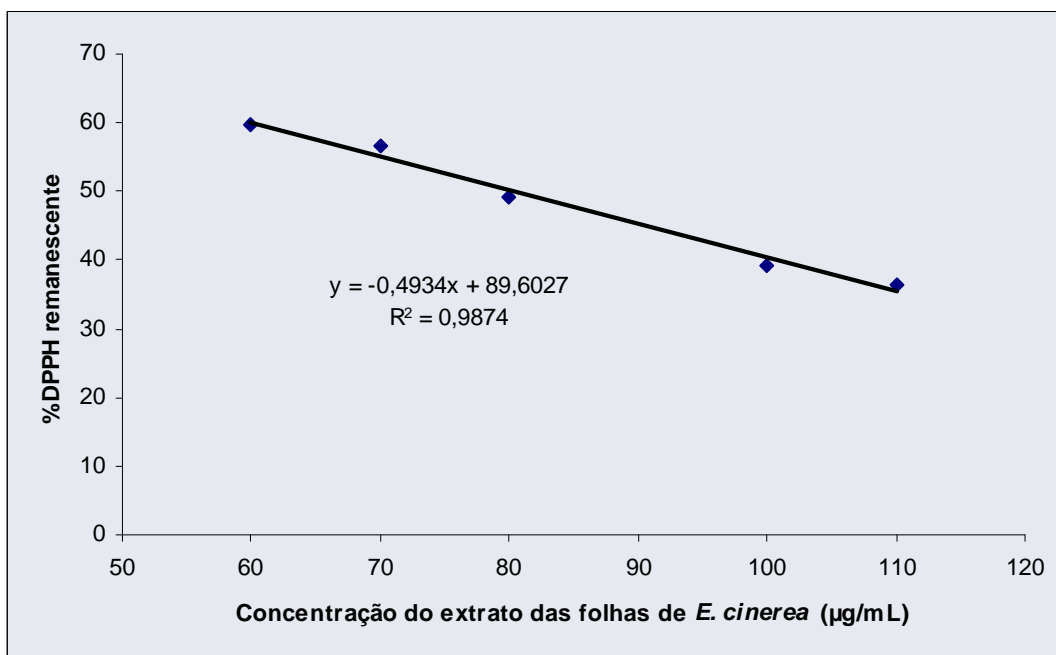


FIGURA 42 - DPPH<sub>REM</sub> PELA CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *E. cinerea* PARA O CÁLCULO DO CE<sub>50</sub> ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA.

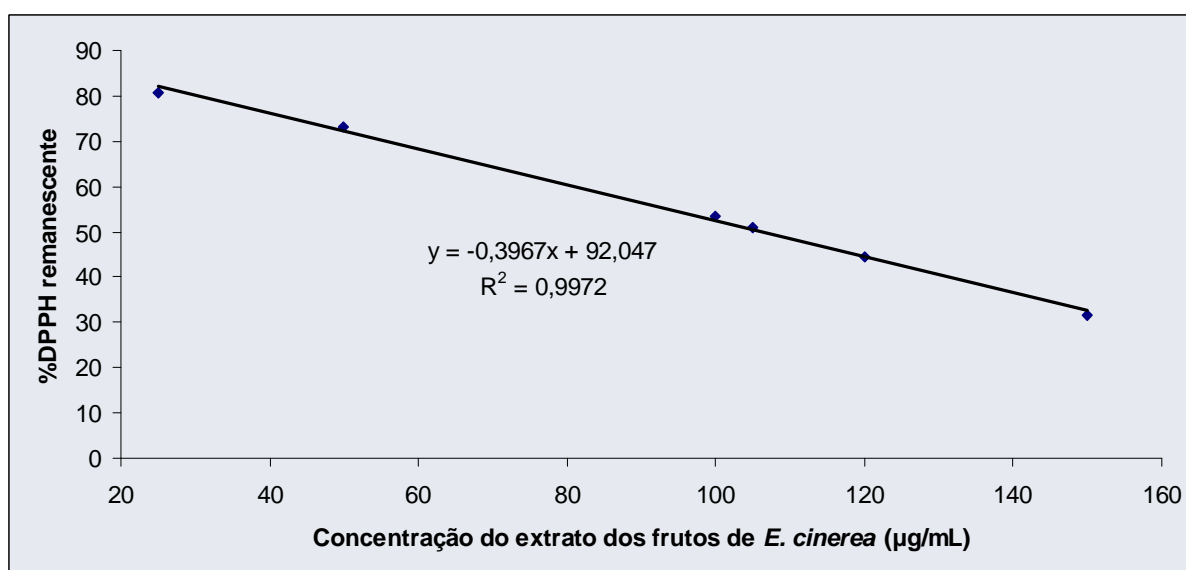


FIGURA 43 - DPPH<sub>REM</sub> PELA CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DOS FRUTOS DE *E. cinerea* PARA O CÁLCULO DO CE<sub>50</sub> ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA.

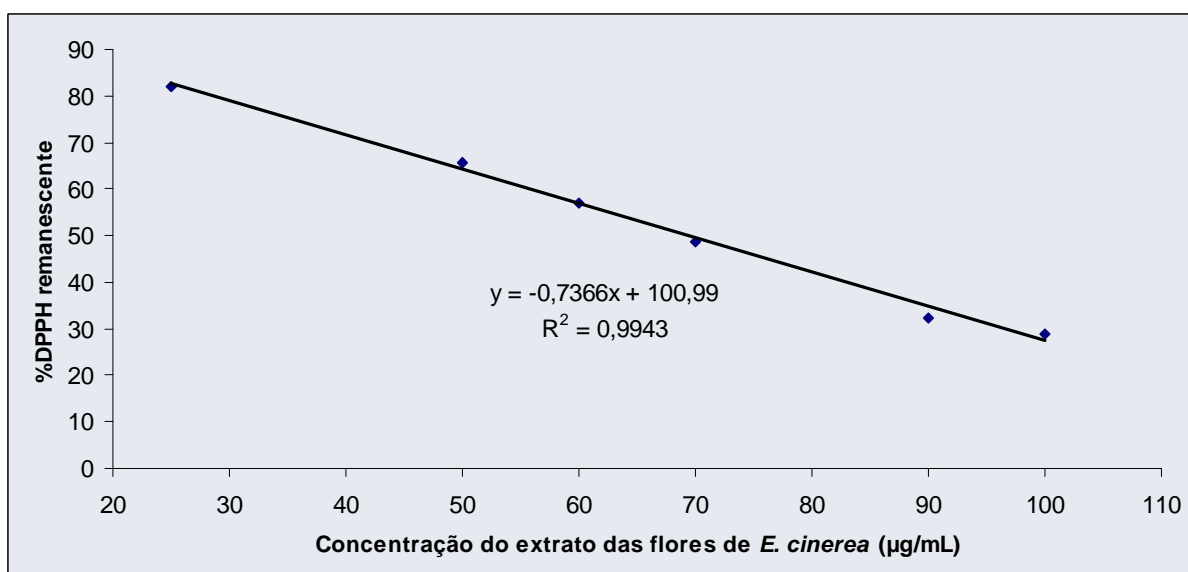


FIGURA 44 - DPPH<sub>REM</sub> PELA CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO DAS FLORES DE *E. cinerea* PARA O CÁLCULO DO CE<sub>50</sub> ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA.

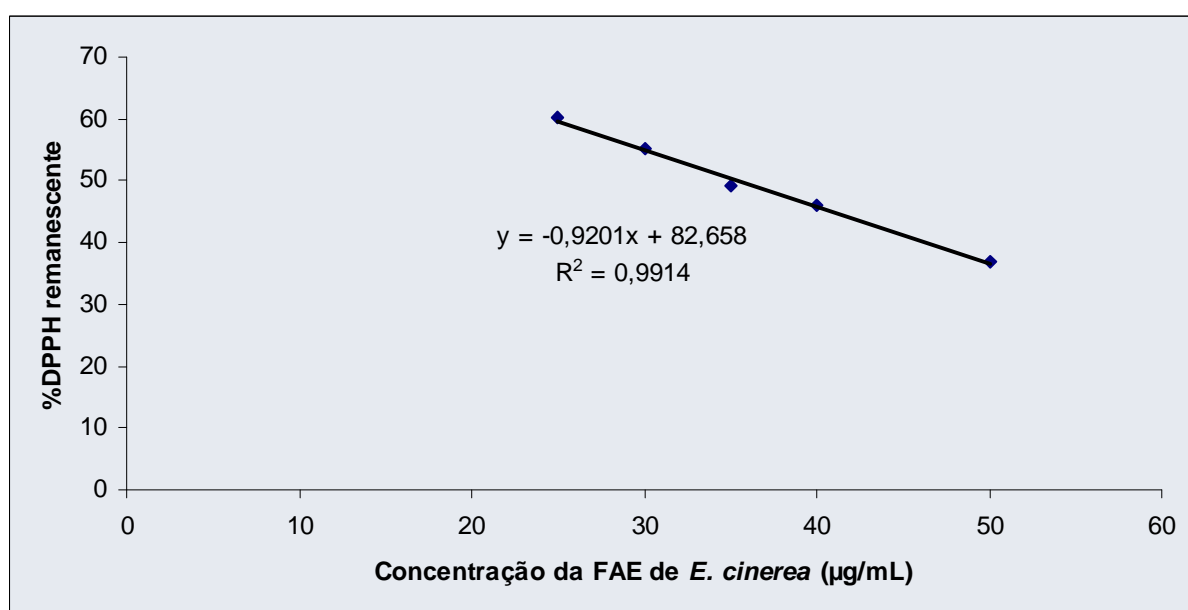


FIGURA 45 - DPPH<sub>REM</sub> PELA CONCENTRAÇÃO DA FAE DE *E. cinerea* PARA O CÁLCULO DO CE<sub>50</sub> ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA.

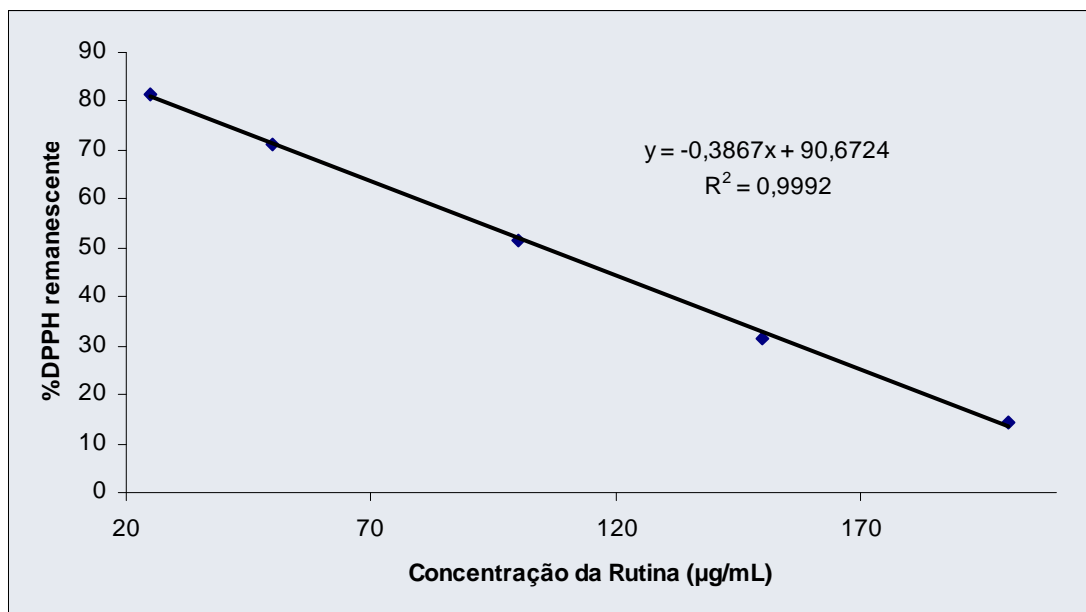


FIGURA 46 -  $\text{DPPH}_{\text{REM}}$  PELA CONCENTRAÇÃO DA RUTINA PARA O CÁLCULO DO  $\text{CE}_{50}$  ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA.

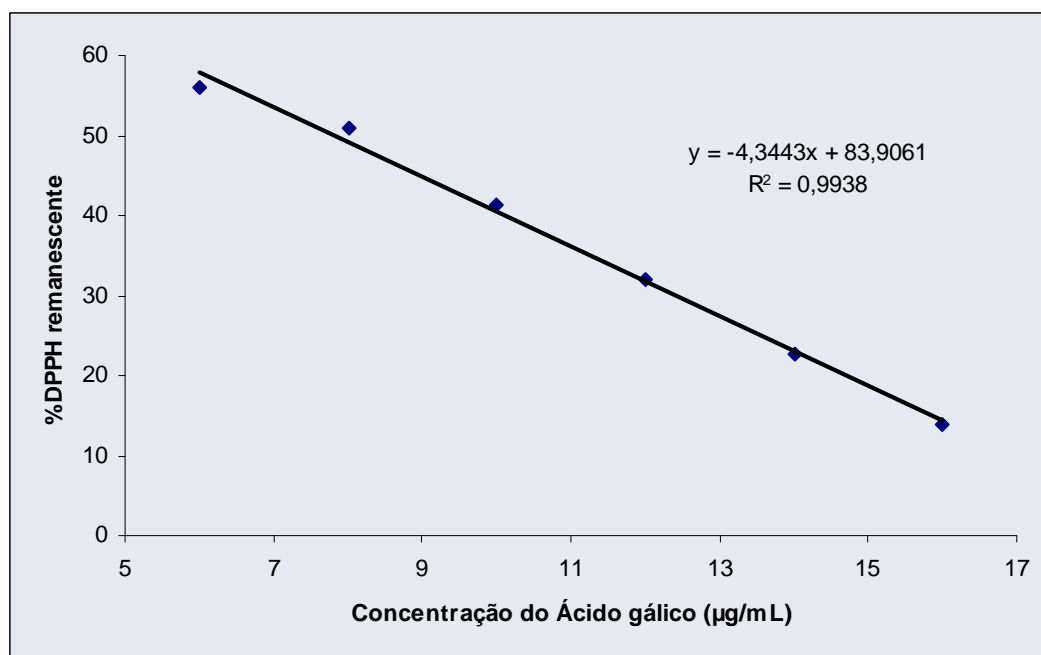


FIGURA 47 -  $\text{DPPH}_{\text{REM}}$  PELA CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO PARA O CÁLCULO DO  $\text{CE}_{50}$  ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA.

Estudos reportados com outras espécies do gênero *Eucalyptus*, como *E. globulus* ssp. *bicostata* sobre a atividade antioxidante frente ao radical DPPH, revelou a  $CE_{50}$  em 2,95  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato metanólico das folhas (MALINOWSKI, 2010). Já a espécie *E. badjensis* apresentou nas folhas  $CE_{50}$  no valor de 5,55  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato aquoso,  $CE_{50} = 16,88 \mu\text{g/mL}$  para o extrato etanólico,  $CE_{50} = 11,71 \mu\text{g/mL}$  para o extrato acetato de etila,  $CE_{50} = 134,99 \mu\text{g/mL}$  para o extrato diclorometano e  $CE_{50} = 355,44 \mu\text{g/mL}$  para o extrato hexânico no ensaio antioxidante pelo método DPPH (ANTÔNIO, 2011).

## 5.13 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 5.13.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *E. cinerea*

#### 5.13.1.1 Difusão em disco dos óleos essenciais

O teste de difusão em disco é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e é estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Commite for Clinical Laboratory Standards) para analisar agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos (BARRY, THORNSBERRY, 1991). Entretanto, as propriedades químicas que os óleos apresentam não permitem que a metodologia padronizada para a atividade antimicrobiana seja totalmente seguida. Dessa forma, modificações foram realizadas baseando-se em outras técnicas propostas na literatura (RIOS, RECIO, VILLAR, 1988; KONEMAN *et al.*, 2001).

Os óleos essenciais de *E. cinerea* foram avaliados para atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. pyogenes*), Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*) e levedura (*C. albicans*) conforme apresentado na Tabela 17.

O halo de inibição para *S. aureus* foi superior ao das demais amostras quando empregado o óleo aromático das folhas secas da coleta do outono. A bactéria *S. pyogenes* mostrou maior inibição para o óleo essencial das folhas frescas do verão. O óleo das flores do outono foi o que apresentou maior atividade contra *P. aeruginosa*. O óleo das folhas frescas da primavera foi o mais ativo contra a levedura testada.

TABELA 17 - DIFUSÃO EM DISCO COM DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.

Microrganismos	Conc.	Folhas frescas				Folhas secas				Flores		Frutos		
		OUT	INV	PRI	VER	OUT	INV	PRI	VER	OUT	INV	OUT	INV	PRI
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	100%	11,5	nt	11,0	10,5	13,0	12,5	10,0	12,0	11,0	11,0	7,0	10,5	9,5
	75%	9,0	nt	9,0	8,5	11,0	11,0	9,5	16,0	9,5	11,0	9,0	10,0	10,0
	50%	7,5	nt	7,0	7,0	9,5	8,5	8,0	15,0	9,0	10,5	7,0	8,0	9,0
	25%	-	nt	-	-	6,8	6,5	6,5	8,0	7,0	7,5	-	7,0	7,3
	CP1	27,5	nt	28,0	27,5	30,5	28,0	28,5	28,5	31,0	31,0	28,5	28,0	28,5
	CN	-	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	100%	10,5	nt	9,5	26,0	11,0	23,5	12,0	14,0	21,0	20,5	14,0	16,0	16,5
	75%	8,0	nt	8,0	12,0	9,0	14,0	9,0	9,5	13,5	18,0	12,5	12,5	9,0
	50%	7,0	nt	7,0	10,5	7,5	10,0	8,0	8,0	12,0	14,0	10,0	8,0	7,0
	25%	6,5	nt	-	9,0	-	-	-	7,5	10,0	12,0	-	6,8	-
	CP1	46,5	nt	46,5	37,0	46,5	35,5	46,5	46,5	40,0	52,5	33,0	46,5	46,5
	CN	-	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	100%	14,5	nt	14,0	14,0	-	-	-	-	17,0	16,0	12,0	14,0	13,5
	75%	12,0	nt	11,5	11,0	-	-	-	-	15,5	14,5	10,0	12,5	10,5
	50%	9,0	nt	9,5	9,0	-	-	-	-	14,0	13,0	8,0	9,0	9,5
	25%	7,0	nt	6,8	7,0	-	-	-	-	9,5	10,0	6,5	7,5	-
	CP1	28,5	nt	26,0	27,5	21,0	17,0	22,5	20,0	32,5	32,0	28,5	29,0	28,0
	CN	-	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	100%	8,0	nt	8,0	8,0	7,0	8,0	7,0	7,0	7,0	8,5	-	8,0	7,0
	75%	7,0	nt	7,3	7,0	6,5	7,0	6,5	6,5	-	-	-	-	-
	50%	-	nt	-	-	-	6,5	-	6,5	-	-	-	-	-
	25%	-	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP1	31,0	nt	31,0	31,0	32,5	28,5	32,5	26,0	33,5	33,0	30,5	30,5	33,5
	CN	-	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	100%	14,0	nt	15,0	14,0	12,0	11,5	11,5	12,5	14,0	11,0	9,0	10,0	9,5
	75%	12,0	nt	11,0	11,0	8,5	9,5	10,0	11,0	9,5	7,0	7,0	8,0	8,0
	50%	9,0	nt	10,0	-	7,0	8,0	8,5	8,5	7,0	7,0	6,5	7,0	7,3
	25%	-	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP2	23,0	nt	22,0	22,5	24,0	24,5	24,0	26,0	25,5	24,0	24,0	25,0	26,0
	CN	-	nt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

nt: não testado; - : não houve halo de inibição do crescimento microbiano.

CP1: controle positivo para bactérias (cloranfenicol 30µg/disco); CP2: controle positivo para fungos (cetoconazol 50 µg/disco); CN: controle negativo (Tween 80 a 10%).

OUT: outono; INV: inverno; PRI: primavera; VER: verão.

#### 5.13.1.2 CIM - Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais

O método de difusão em disco foi empregado com o objetivo de verificar, preliminarmente, os potenciais antimicrobianos dos óleos essenciais puros e diluídos frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Uma vez realizado este *screening* preliminar, selecionaram-se as amostras cujos halos de inibição na



difusão em disco fossem superiores a 8 mm para proceder o método de microdiluição (AYRES *et al.*, 2008).

O intuito do método de microdiluição é determinar a CIM de cada amostra diante dos diferentes microrganismos. O método da microdiluição vem sendo bastante utilizado, devido à sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes e amostras, o que possibilita um maior número de repetições, aumentando a confiabilidade dos resultados.

Esse método não foi realizado para a bactéria *E. coli* pelo motivo de que esta não se mostrou sensível às amostras.

Embora as folhas sejam o material vegetal mais explorado devido ao fato de serem encontradas durante o ano todo, os óleos essenciais referentes a flores e frutos apresentaram resultados mais efetivos em relação ao óleo volátil das folhas, obtendo-se CIM de 1,56 mg/mL e 0,78 mg/mL, nas estações outono e inverno, respectivamente, diante de ambos os microrganismos *P. aeruginosa* e *C. albicans* (Tabela 18).

Nos testes realizados frente à bactéria *S. aureus*, a amostra do óleo das folhas secas do verão apresentou atividade antimicrobiana até a concentração de 0,78 mg/mL, a menor CIM encontrada para essa cepa.

As amostras dos óleos aromáticos das folhas secas das estações outono e inverno merecem destaque quanto aos seus potenciais antimicrobianos contra a cepa *S. pyogenes* (CIM < 0,39 mg/mL), sendo este o menor resultado observado em todos os testes realizados.

Para o nosso conhecimento, esta investigação reporta, pela primeira vez, o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de frutos e flores de *E. cinerea*.

As atividades antimicrobianas dos óleos essenciais variaram de acordo com a concentração e o tipo de bactéria. Estas diferenças na susceptibilidade dos microrganismos testados com os óleos essenciais podem ser atribuídas a uma variação na taxa de penetração do componente ativo do óleo essencial através da parede celular e estruturas da membrana celular (HANAMANTHAGOUDA *et al.*, 2010).

As bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis às propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais do que as Gram-negativas, devido a sua membrana lipopolissacarídica que restringe a difusão de componentes hidrofóbicos (COX *et al.*, 2001; HANAMANTHAGOUDA *et al.*, 2010), o que condiz com os

resultados observados para as amostras de *E. cinerea*. As bactérias Gram-positivas permitem contato direto dos componentes hidrofóbicos dos óleos essenciais com a bicamada fosfolipídica da membrana da célula, onde provocam seus efeitos como o aumento da permeabilidade de íons e extravasamento dos constituintes vitais intracelulares, ou comprometimento dos sistemas enzimáticos das bactérias (SANDRI *et al.*, 2007). Alguns pesquisadores têm relatado uma relação entre as estruturas químicas dos compostos mais abundantes nos óleos essenciais e sua atividade antibacteriana (BURT, 2004).

A grande diversidade de grupos químicos que compõem os óleos essenciais sugere que a atividade antimicrobiana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas sim a vários (SKANDAMIS *et al.*, 2001; CARSON, MEE, RILEY, 2002). Estes mecanismos não são, necessariamente, em alvos diferentes, sendo alguns dependes de outros (BURT, 2004).

Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela ação antimicrobiana de óleos essenciais. Há evidências de que os componentes minoritários dos óleos essenciais apresentem um papel fundamental nas propriedades antimicrobianas, devido ao efeito sinérgico (BURT, 2004).

Grande importância deve ser dada ao 1,8-cineol (eucaliptol), devido ao fato de este ter representado aproximadamente 75% do óleo essencial de *E. cinerea*.

A literatura traz que o 1,8-cineol apresenta propriedades antimicrobianas relativamente fortes contra muitos patógenos importantes e deterioradores de alimentos, incluindo *S. aureus*, *Fusarium solani*, *E. coli* e *Bacillus subtilis* (GILLES *et al.*, 2010). Compostos como o limoneno, linalool, gama-terpineno, *p*-cimeno,  $\alpha$ -pineno e  $\alpha$ -terpineol também demonstram atividade antimicrobiana (BAKKALI *et al.*, 2008; GILLES *et al.*, 2010). De acordo com van Vuuren e Viljoen (2007) – o limoneno e o 1,8-cineol apresentam efeito sinérgico quando avaliada a atividade antimicrobiana.

O principal responsável pela atividade antimicrobiana contra *S. aureus* foi o terpineol que mostrou 8 vezes mais atividade que o próprio 1,8-cineol para a espécie *E. radiata* (INOUE, TAKIZAWA, YAMAGUCHI, 2001; TYAGI, MALIK, 2011). Em algumas das amostras de óleo essencial de *E. cinerea* (folhas frescas do verão e frutos da primavera) foi encontrada uma concentração relativamente relevante de terpineol (11,72% e 10,80%), respectivamente.

Os monoterpenos oxigenados (por exemplo, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol) podem estar envolvidos em uma maior atividade antimicrobiana do que os monoterpenos hidrocarbonetos ( $\alpha$ -pineno, delta-3-careno, limoneno) encontrados em óleos essenciais (CARSON, RILEY, 1995; BURT, 2004; ESPINA *et al.*, 2011).

TABELA 18 - CIM (mg/mL) DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS, FLORES E FRUTOS DE *E. cinerea*.

Microrganismos	Folhas Frescas				Folhas Secas				Flores		Frutos			Controles <sup>a</sup>	
	OUT	INV	PRI	VER	OUT	INV	PRI	VER	OUT	INV	OUT	INV	PRI	CP1	CP2
<i>S. aureus</i>	3,12	nt	3,12	12,50	3,12	3,12	1,56	0,78	3,12	3,12	6,25	3,12	3,12	3,75	nt
<i>S. pyogenes</i>	3,12	nt	1,56	6,25	< 0,39	< 0,39	3,12	1,56	3,12	1,56	1,56	1,56	1,56	1,87	nt
<i>P. aeruginosa</i>	3,12	nt	3,12	3,12	*	*	*	*	1,56	3,12	3,12	1,56	3,12	1,87	nt
<i>E. coli</i>	*	nt	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>C. albicans</i>	1,56	nt	1,56	6,25	3,12	3,12	3,12	1,56	0,78	1,56	1,56	0,78	0,78	nt	3,12

nt: não testado, \* : CIM não realizada devido o halo de inibição < 8 mm na difusão em disco.

OUT: outono; INV: inverno; PRI: primavera; VER: verão.

CP1: controle positivo para bactérias (cloranfenicol); CP2: controle positivo para fungos (cetoconazol).

<sup>a</sup>: valores de CIM (mg/mL) multiplicados por 1000 para os controles.

### 5.13.2 Atividade antimicrobiana dos extratos e da FAE de *E. cinerea*

#### 5.13.2.1 Difusão em disco dos extratos e da FAE

O método de difusão em disco em meio sólido foi usado para analisar, *in vitro*, a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos orgânicos (hexânico, diclorometano, acetato de etila, alcoólico 100%, alcoólico 70% e alcoólico 50%) das folhas, frutos e flores, e da FAE. Os resultados foram expressos pela média dos valores em triplicata, conforme demonstra a Tabela 19 referente aos extratos e a Tabela 20 referente à FAE.

A informação adquirida pelo método de difusão em disco é qualitativa, útil para estabelecer a sensibilidade do microrganismo, mas não para estabelecer uma comparação da potência antimicrobiana das amostras e dos antibióticos (BRESOLIN, CECHINEL FILHO, 2003).

De maneira geral as amostras dos extratos orgânicos de *E. cinerea* apresentaram capacidade antimicrobiana diante das cepas de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, com exceção da bactéria Gram-negativa *E. coli* que se manifestou mais resistente.

Os extratos hexânico, diclorometano e acetato de etila obtidos tanto das folhas, como dos frutos e flores foram os mais efetivos, independente da concentração testada, contra *S. aureus*, *S. pyogenes* e *P. aeruginosa*. O resultado de maior valor no halo de inibição de crescimento microbiano foi observado nos extratos hexano e diclorometano das flores frente ao *S. pyogenes*.

Os extratos alcoólicos mostraram bastante especificidade em suas atividades: o extrato alcoólico das folhas inibiu o crescimento de *S. aureus*; o extrato alcoólico dos frutos mostrou atividade inibitória frente *P. aeruginosa* e a levedura *C. albicans*; o extrato alcoólico das flores foi ativo contra *S. aureus*, *S. pyogenes* e *P. aeruginosa*; o extrato alcoólico a 70% das flores apresentou propriedade antimicrobiana diante de *S. aureus*, *S. pyogenes* e *C. albicans*; e o extrato alcoólico a 50% das flores na mais elevada concentração revelou inibição apenas com o microrganismo *S. aureus*.

O potencial antibacteriano e antifúngico de polifenóis é conhecido na literatura, como os flavonóides e os taninos, em que estes grupos de compostos podem ser obtidos nos extratos através de solventes orgânicos (COSTA, 1986; COWAN, 1999; SIMÕES *et al.*, 2003).

Em se tratando da fração FAE de *E. cinerea*, pode-se afirmar que o melhor resultado para o halo de inibição em aproximadamente 28 mm, foi observado na cepa de *S. pyogenes*, sendo muito mais ativa para esta bactéria quando comparado aos demais microrganismos analisados.

TABELA 19 - DIFUSÃO EM DISCO COM DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm) DOS EXTRATOS.

Microrganismos	Conc. (mg/mL)	HEX			CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>			AcOEt			EtOH			EtOH 70			EtOH 50		
		FO	FR	FL	FO	FR	FL	FO	FR	FL	FO	FR	FL	FO	FR	FL	FO	FR	FL
<i>S. aureus</i>	100	9,0	9,3	11,0	10,5	9,0	10,5	10,0	10,0	12,5	11,0	-	10,0	-	-	8,5	-	-	7,0
	75	9,0	8,8	10,5	9,0	9,0	10,0	9,0	8,8	11,0	9,0	-	9,5	-	-	8,0	-	-	-
	50	8,0	8,0	9,5	9,0	8,5	9,5	8,0	8,0	10,5	9,0	-	8,5	-	-	7,0	-	-	-
	25	7,0	7,5	9,0	8,0	8,0	9,0	8,0	6,8	10,0	8,0	-	8,0	-	-	7,0	-	-	-
	CP1	27,5	26,0	26,0	26,5	28,0	23,5	28,0	26,0	29,0	27,0	25,5	29,0	29,0	31,0	29,5	29,0	30,0	29,0
	CN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i>	100	13,0	13,5	17,5	13,5	11,0	17,5	12,5	10,0	12,0	-	-	9,0	-	-	11,0	-	-	-
	75	11,0	13,0	17,5	12,5	11,0	17,5	12,5	9,5	11,5	-	-	-	-	-	10,0	-	-	-
	50	10,5	12,5	16,5	12,0	11,0	17,5	12,0	9,5	10,5	-	-	-	-	-	9,5	-	-	-
	25	9,5	12,0	15,5	11,0	10,0	15,0	10,5	7,0	9,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP1	30,5	24,5	28,0	30,0	23,0	31,5	29,0	29,0	30,0	27,5	26,0	27,0	27,0	32,0	26,0	29,0	28,0	28,0
	CN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	100	9,0	10,0	11,0	10,0	9,0	11,0	9,0	9,0	12,5	-	7,3	7,5	-	-	-	-	-	-
	75	9,0	10,5	11,0	9,5	8,5	10,5	9,0	8,5	11,0	-	6,5	7,5	-	-	-	-	-	-
	50	8,0	10,0	10,0	8,5	7,5	10,0	8,5	8,0	11,0	-	-	7,0	-	-	-	-	-	-
	25	7,0	8,5	10,0	7,5	7,0	9,5	7,0	7,5	9,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP1	24,5	22,5	24,5	24,5	26,0	24,0	23,5	23,0	25,5	25,0	23,0	25,5	20,0	25,0	24,5	20,0	29,0	24,5
	CN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP1	30,0	31,5	31,5	27,5	31,0	28,5	27,0	31,5	31,0	26,5	32,5	31,0	28,0	30,0	30,0	30,0	31,0	29,5
	CN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	100	-	-	-	-	-	-	-	10,0	-	-	10,0	-	-	-	9,0	-	-	-
	75	-	-	-	-	-	-	-	10,0	-	-	9,0	-	-	-	10,0	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	9,5	-	-	-	-	-	-	9,0	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CP2	22,5	21,0	21,0	22,5	23,5	21,0	22,5	22,0	23,0	22,5	22,0	22,0	22,0	22,0	22,5	22,0	22,0	22,0
	CN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : não houve halo de inibição do crescimento microbiano.; Conc.: concentração.

HEX: hexano; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: diclorometano; AcOEt: acetato de etila; EtOH: etanol 100%; EtOH 70: etanol 70%; EtOH 50: etanol 50%.

FO: folhas; FR: frutos; FL: flores.

CP1: controle positivo para bactérias (cloranfenicol 30µg/disco); CP2: controle positivo para fungos (cetoconazol 50 µg/disco).

CN: controle negativo (DMSO).

TABELA 20 - DIFUSÃO EM DISCO COM DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO (mm) DA FAE.

Microrganismos	Conc. (mg/mL)	FAE
<i>S. aureus</i>	100	14,0
	75	13,0
	50	11,0
	25	8,7
	CP1	26,3
	CN	-
<i>S. pyogenes</i>	100	28,3
	75	26,0
	50	23,0
	25	18,3
	CP1	33,7
	CN	-
<i>P. aeruginosa</i>	100	14,0
	75	12,7
	50	11,7
	25	9,3
	CP1	23,3
	CN	-
<i>E. coli</i>	100	7,5
	75	7,0
	50	-
	25	-
	CP1	27,7
	CN	-
<i>C. albicans</i>	100	9,0
	75	-
	50	-
	25	-
	CP2	23,0
	CN	-

- : não houve halo de inibição do crescimento microbiano.

Conc.: concentração.

CP1: controle positivo para bactérias (cloranfenicol 30µg/disco).

CP2: controle positivo para fungos (cetoconazol 50 µg/disco).

CN: controle negativo (DMSO).

#### 5.13.2.2 CIM - Concentração Inibitória Mínima dos extratos e da FAE

Através deste método, é possível se determinar a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo. Este método tem a vantagem de ser quantitativo e de ser usado tanto para amostra solúvel em água, quanto lipossolúvel. Com o emprego de

microplacas e indicadores químicos de crescimento microbiano, reduz parte de alguns problemas, como o excessivo trabalho envolvido na realização desta técnica, além do consumo de material utilizado (BRESOLIN, CECHINEL FILHO, 2003).

Nos ensaios realizados através da microdiluição, o crescimento microbiano foi avaliado pela adição do revelador TTC, observando visualmente nos poços das microplacas as amostras que não apresetaram ação antimicrobiana, ocorrendo a formação da coloração róseo-avermelhada. As Tabelas 21 e 22 expõem as CIM atingidas pelas amostras diante dos microrganismos testados.

A CIM dos extratos de *E. cinerea* apresentou melhores resultados para os extratos hexânico e diclorometano dos frutos e flores, com valores menores que 0,03 mg/mL contra *S. aureus*, *S. pyogenes* e *P. Aeruginosa* (Tabela 21). A CIM da substância FAE mostrou como bom resultado em 0,15 mg/mL frente *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Tabela 22).

De acordo com a proposta de Machado *et al.* (2005), a classificação das propriedades antimicrobianas neste estudo com *E. cinerea* foi seguida estabelecendo valores de CIM menores que 10 µg/mL (=0,01 mg/mL) como atividade antimicrobiana excelente, valores entre 10 e 100 µg/mL (=0,01 e 0,1 mg/mL) como boa atividade, valores entre 100 e 500 µg/mL (=0,1 e 0,5 mg/mL) como atividade moderada e valores acima de 500 µg/mL (=0,5 mg/mL) são considerados de atividade fraca ou nula.

Assim, a espécie em estudo o extrato hexânico dos frutos e flores e o extrato diclorometano obtido das flores revelaram boa atividade frente as bactérias *S. aureus*, *S. pyogenes* e *P. aeruginosa*. Os extratos diclorometano dos frutos e o acetato de etila das folhas também apresentaram uma boa atividade contra *S. pyogenes* e *P. aeruginosa*. Os extratos hexano e diclorometano das folhas mostraram atividade moderada diante das cepas de *S. aureus*, *S. pyogenes* e *P. aeruginosa*. A atividade moderada também foi verificada para o extrato acetato de etila dos frutos contra os microrganismos *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, e no extrato hidroalcoólico 70% das flores frente *S. aureus* e *S. pyogenes*.

Para a FAE, foi classificado o efeito antimicrobiano como moderado diante das bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. pyogenes*) e Gram-negativa (*P. aeruginosa*).

Na pesquisa feita por Antônio (2011), foi avaliada a atividade antimicrobiana pela microdiluição realizada com extratos (hexano, diclorometano e acetato de etila) das folhas de *E. badjensis*, apresentando moderada atividade contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* e boa atividade apenas para *Staphylococcus epidermidis*.



TABELA 21 - CIM (mg/mL) DOS EXTRATOS DE FOLHAS, FLORES E FRUTOS DE *E. cinerea*.

Microrganismos	HEX			CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>			AcOEt			EtOH			EtOH 70			EtOH 50			Controles <sup>a</sup>	
	FO	FR	FL	FO	FR	FL	FO	FR	FL	FO	FR	FL	FO	FR	FL	FO	FR	FL	CP1	CP2
<i>S. aureus</i>	0,31	< 0,03	< 0,03	0,31	0,31	< 0,03	0,15	0,31	0,62	1,25	*	0,62	*	*	0,31	*	*	*	7,50	nt
<i>S. pyogenes</i>	0,15	< 0,03	< 0,03	0,15	< 0,03	< 0,03	0,07	0,15	0,15	*	*	*	*	*	0,15	*	*	*	1,87	nt
<i>P. aeruginosa</i>	0,15	< 0,03	< 0,03	0,15	0,07	< 0,03	0,07	0,31	0,62	*	*	*	*	*	*	*	*	*	3,75	nt
<i>E. coli</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>C. albicans</i>	*	*	*	*	*	*	*	0,31	*	*	2,50	*	*	*	0,62	*	*	*	nt	3,12

\* : CIM não realizada devido o halo de inibição < 8 mm na difusão em disco.

HEX: hexano; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: diclorometano; AcOEt: acetato de etila; EtOH: etanol 100%; EtOH 70: etanol 70%; EtOH 50: etanol 50%.

FO: folhas; FR: frutos; FL: flores.

CP1: controle positivo para bactérias (cloranfenicol); CP2: controle positivo para fungos (cetoconazol); nt: não testado.

<sup>a</sup>: valores de CIM (mg/mL) multiplicados por 1000 para os controles.

TABELA 22 - CIM (mg/mL) DA FAE DE *E. cinerea*.

Microrganismos	FAE	Controles <sup>a</sup>	
		CP1	CP2
<i>S. aureus</i>	0,15	7,50	nt
<i>S. pyogenes</i>	0,31	1,87	nt
<i>P. aeruginosa</i>	0,15	3,75	nt
<i>E. coli</i>	*	*	*
<i>C. albicans</i>	1,25	nt	3,12

\* : CIM não realizada devido o halo de inibição < 8 mm na difusão em disco.

CP1: controle positivo para bactérias (cloranfenicol).

CP2: controle positivo para fungos (cetoconazol).

nt: não testado.

<sup>a</sup>: valores de CIM (mg/mL) multiplicados por 1000 para os controles.

#### 5.14 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

A patologia clínica em aves é usada na medicina veterinária há muitos anos para avaliar as alterações metabólicas que possam indicar algum sinal de doença nos animais (SCHMIDT *et al.*, 2007). A aplicação mais usual da hematologia é realizada para acompanhar a saúde geral do animal e avaliar sua capacidade para transportar oxigênio e defender-se contra os agentes infecciosos (VOIGT, 2003).

As principais causas de anemia nas aves são: parasitismo, traumas, intoxicações, sepsis bacteriana (salmonelose), neoplasias e doenças crônicas (SCHMIDT *et al.*, 2007).

Na avaliação de atividade antiparasitária em pombos-domésticos (*Columba livia*), nas 20 aves selecionadas foi possível observar visualmente que ocorreu uma diminuição na infestação de ectoparasitos (piolho de pombo ordem Phthiraptera) alojados nas suas penas, após a aplicação em *spray* do produto formulado a base de óleo essencial de *E. cinerea* a 3%.

Segundo a pesquisa de Toloza e colaboradores (2006) realizada com o óleo essencial de *E. cinerea* e outras espécies vegetais demonstraram propriedades de repelência e atividade fumegante contra o *Pediculus humanus capitis* (piolho humano).

Para monitoriamento das aves em análise, foram efetuados exames hematológicos – concentração de hematócrito – antes e após a aplicação do produto (Tabela 23) para verificar se o animal apresenta anemia, uma patologia normalmente relacionada ao estresse promovido pela alta infestação de ectoparasitas. Observou-se que das 20 aves selecionadas, 4 delas (20%) indicavam anemia antes de dar início ao tratamento, com valores da concentração de hematócrito inferiores a 35% (taxa de referência 35 a 55%) (SCHMIDT *et al.*, 2007). Ao término do tratamento com a utilização do óleo essencial de *E. cinerea*, apenas 2 aves (10%) apresentavam anemia, o que significa uma melhoria de 50% no estado de saúde do grupo de animais, devido à redução da infestação dos ectoparasitos.

Os resultados obtidos propõem que o óleo essencial de *E. cinerea* pode ser efetivo no controle da infestação por piolho de pombo em aves, sendo obrigatório pelo menos três aplicações semanais do produto para que haja o controle efetivo do parasito, porém há necessidade de maiores investigações.

TABELA 23 – CONCENTRAÇÃO DE HEMATÓCRITO EM AVES.

Amostra de sangue de aves <i>Columba livia</i>	Hematócrito (%)		Valor de referência (SCHMIDT <i>et al.</i> , 2007)
	Antes da aplicação do óleo essencial de <i>E. cinerea</i>	Após a aplicação do óleo essencial de <i>E. cinerea</i>	
1	46	36	35 a 55%
2	46	45	
3	42	43	
4	45	45	
5	43	47	
6	43	49	
7	44	36	
8	43	44	
9	49	46	
10	45	43	
11	39	39	
12	35	36	
13	48	39	
14	36	35	
15	33	33	
16	32	38	
17	38	37	
18	37	36	
19	34	36	
20	29	31	

### 5.15 ENSAIOS DE ESTABILIDADE

Os testes preliminares de estabilidade foram avaliados em 6 ciclos de estabilidade em um período estabelecido durante 6 meses.

Quanto às características organolépticas: aspecto, cor e odor, apresentaram aspecto homogêneo, odor característico de óleo essencial de *E. cinerea*, cor amarelo claro na concentração de 3% e na concentração de 0,3% amarelo

extremamente claro a incolor. Essas características se mantiveram, sem alteração, levando em consideração os ambientes e as embalagens em que as amostras foram mantidas, até o sexto mês avaliado (Tabela 24).

Os resultados da determinação do valor do pH, representados nas Figuras 48 e 49, foram obtidos até o ciclo 6 das amostras com 3% e 0,3% de óleo essencial de *E. cinerea*, submetidas à temperatura ambiente, em estufa à 40 °C e sob refrigeração à 4 °C, considerando os quatro diferentes tipos de embalagens. Como parâmetro de aceitação, a faixa de pH considerada adequada para a formulação deve ser de 4 a 5. E quanto ao armazenamento do produto foi observado que em temperaturas elevadas ocorre pequenas variações no valor do pH, visto que a embalagem de vidro âmbar mantida sob refrigeração à 4 °C foi a escolha apropriada para proceder o teste em campo, com a atividade antiparasitária.

**TABELA 24 – AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ORGANOLÉPTICOS DA SOLUÇÃO CONTENTO ÓLEO ESSENCIAL DE *E. cinerea*.**

	Tempo					
	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4	Mês 5	Mês 6
<b>Cor</b>	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
<b>Odor</b>	Característico de óleo essencial de <i>E. cinerea</i>	Característico de óleo essencial de <i>E. cinerea</i>	Característico de óleo essencial de <i>E. cinerea</i>	Característico de óleo essencial de <i>E. cinerea</i>	Característico de óleo essencial de <i>E. cinerea</i>	Característico de óleo essencial de <i>E. cinerea</i>
<b>Aspecto</b>	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração

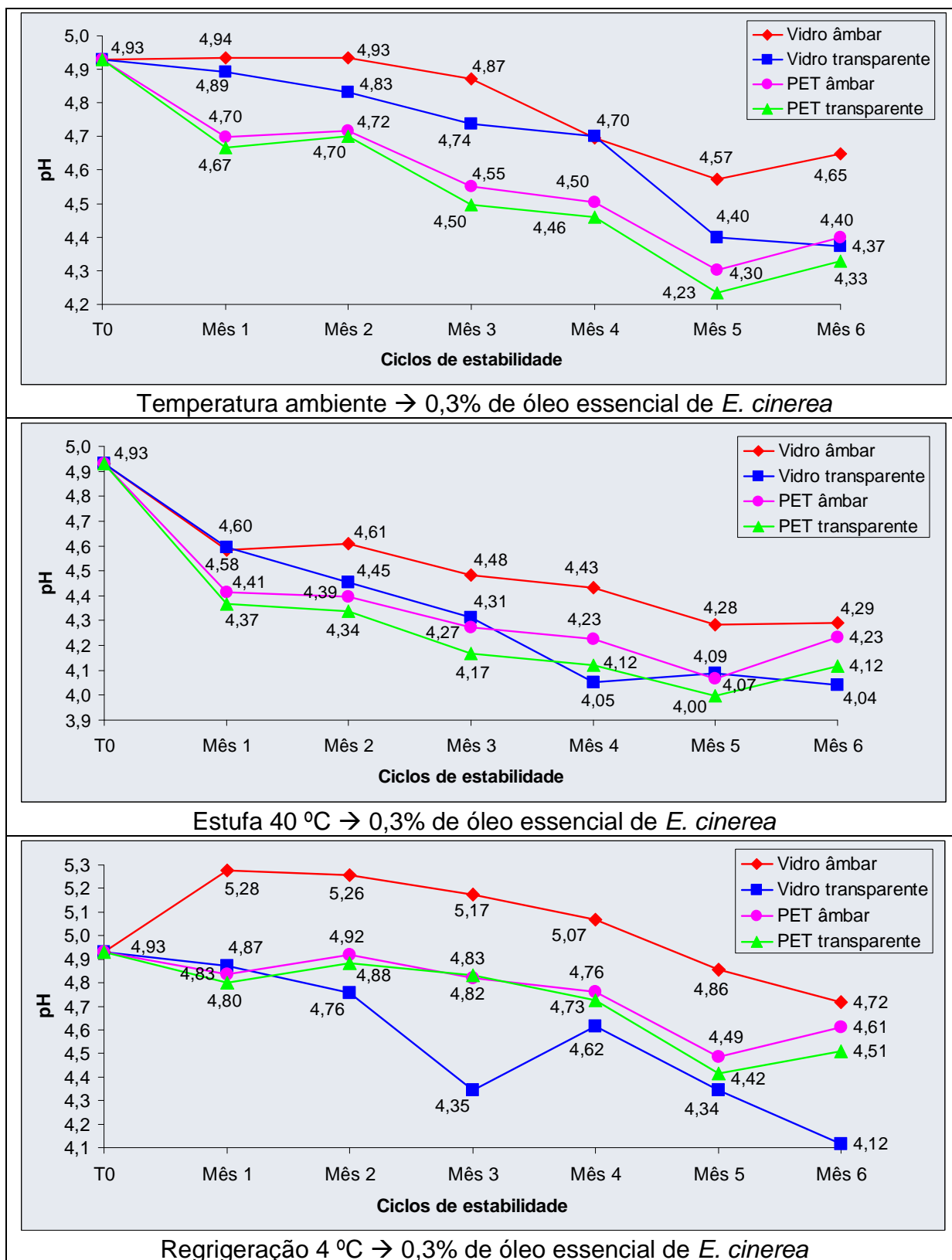


FIGURA 48 – PERFIL DO pH DURANTE OS TESTES DE ESTABILIDADE OBTIDO DAS AMOSTRAS DE SOLUÇÃO COM 0,3% DE ÓLEO ESSENCIAL DE *E. cinerea*, SUBMETIDAS À TEMPERATURA AMBIENTE, ESTUFA 40 °C E SOB REFRIGERAÇÃO 4 °C, EM QUATRO DIFERENTES TIPOS DE EMBALAGENS.

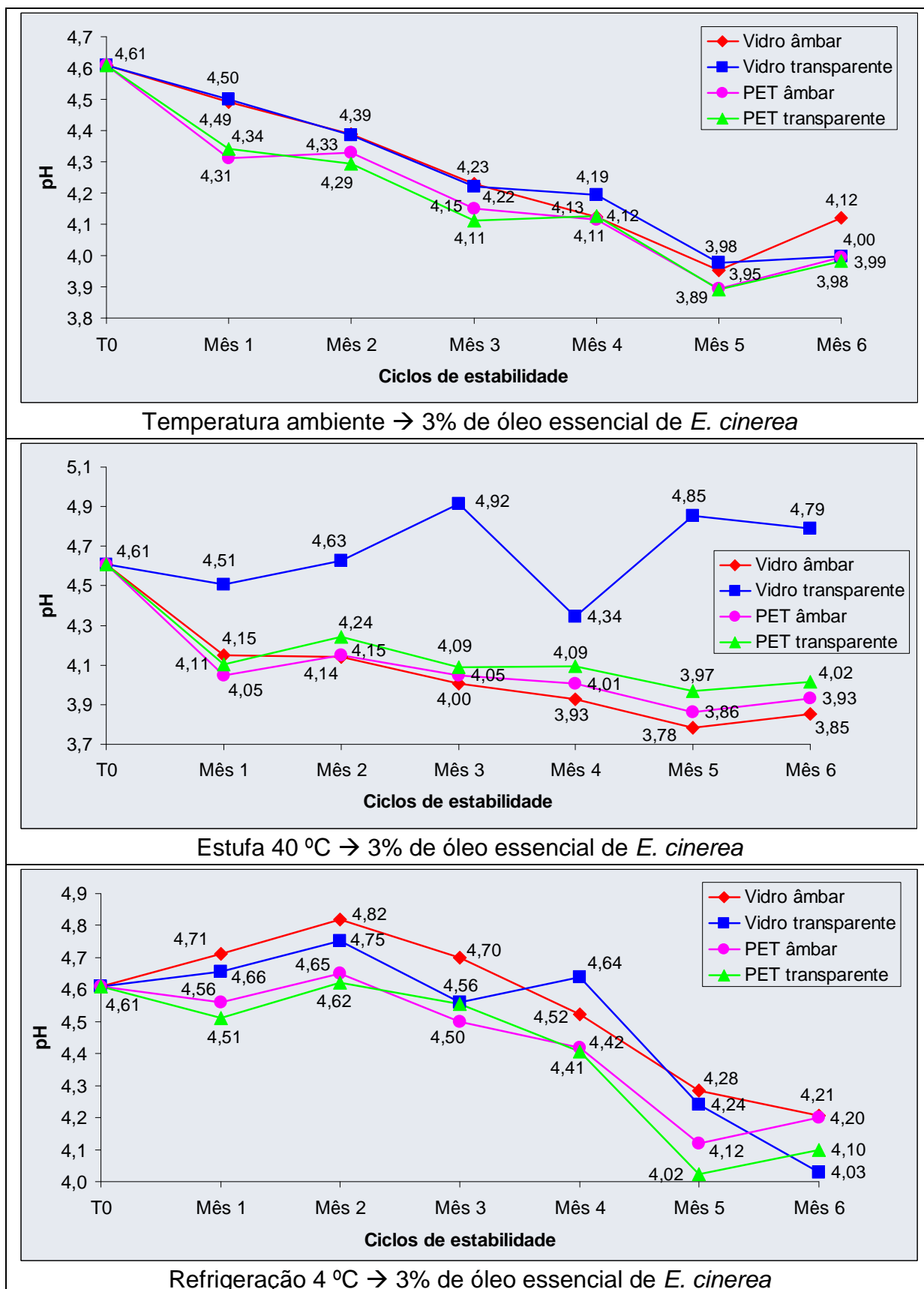


FIGURA 49 – PERFIL DO pH DURANTE OS TESTES DE ESTABILIDADE OBTIDO DAS AMOSTRAS DE SOLUÇÃO COM 3% DE ÓLEO ESSENCIAL DE *E. cinerea*, SUBMETIDAS À TEMPERATURA AMBIENTE, ESTUFA 40 °C E SOB REFRIGERAÇÃO 4 °C, EM QUATRO DIFERENTES TIPOS DE EMBALAGENS.

Baseando-se nos resultados preliminares apresentados pode-se sugerir que é possível desenvolver uma fórmula farmacêutica que contenha o óleo essencial de *E. cinerea* e que esta formulação é capaz de se manter estável ao longo de pelo menos 6 meses.

Assim, seria interessante que mais testes de estabilidade sejam desenvolvidos para garantir uma melhor qualidade, segurança e eficácia do produto, seguindo as normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (ANVISA, 2004; ANVISA, 2007).

## 6 CONCLUSÕES

A presença de características morfoanatômicas normalmente encontradas em representantes da família Myrtaceae e do gênero *Eucalyptus* foi demonstrado para *E. cinerea*. O destaque para esta espécie foi a sua grande quantidade de cera epicuticular cristalóide tubular. Conclui-se que os resultados obtidos para as folhas *E. cinerea*, tanto morfológicamente e anatomicamente, são elementos científicos de grande importância no controle farmacognóstico da espécie.

A amostra de folhas secas de *E. cinerea* apresentou o melhor rendimento de óleo essencial no período do verão (5,02%). O rendimento de óleo das folhas secas permaneceu superior comparado com o das folhas frescas em qualquer estação.

As análises físico-químicas mostraram valores semelhantes entre períodos sazonais e entre as partes aéreas para a densidade relativa, o índice de refração e o poder rotatório. Para a solubilidade foi constatado que em todas as amostras é necessária mais de uma parte de volume de etanol 70% para que o óleo se torne miscível.

*E. cinerea* é uma espécie que pode ser empregada como uma fonte de produção de 1,8-cineol, uma vez que as suas partes aéreas (folhas, flores e frutos) se destacaram em todas as estações do ano pela riqueza deste composto, atingindo até 85,3%. Além de outros compostos principais:  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\alpha$ -terpineol, acetato de  $\alpha$ -terpinila.

O extrato alcoólico a 70% das flores (14,45%) e o extrato de acetato de etila das folhas (13,45%) de *E. cinerea* foram os que apresentaram maiores rendimentos comparados com os outros extratos orgânicos.

Na determinação de fenóis totais, com o uso do reagente Folin-Ciocalteu, os resultados do conteúdo de fenóis totais nos extratos acetônicos foram superiores aos extratos etanólicos para folhas, flores e frutos.

O maior teor de flavonoides totais foi verificado para o extrato das folhas, enquanto que para taninos o maior teor foi no extrato das flores.

Pode-se concluir que o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , no estado sólido, da fração semipurificada FAE obtida a partir do extrato bruto das folhas de *E. cinerea*, é composta por unidades de flavan-3-óis, sugerindo que a mesma seja composta de proantocianidinas, além da presença de unidade de ácido gálico.



Pelas análises de RMN 1D (RMN -<sup>1</sup>H e RMN -<sup>13</sup>C), RMN 2D (COSY -<sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H), polarimetria e dicroísmo circular, pode-se afirmar que a substância isolada F1-2#10 trata-se de *ent*-catequina, descrita pela primeira vez no gênero *Eucalyptus* e na espécie em estudo.

Os melhores resultados da atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio foram observados para os extratos aquosos das folhas e frutos em aproximadamente 21% e 24% respectivamente nas concentrações de 300 µg/mL e 200 µg/mL.

A atividade antioxidante avaliada pelo método DPPH mostrou que os extratos etanólicos de *E. cinerea* e a FAE possuem atividade sequestradora do radical DPPH.

Este estudo revelou que as amostras de óleos essenciais, os extratos orgânicos de folhas, flores e frutos (hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol, etanol 70% e etanol 50%), e a FAE de *E. cinerea* mostraram um potencial antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, no *screening* preliminar através do método de difusão em disco, e na quantificação da concentração inibitória mínima – CIM.

Esta pesquisa reporta, pela primeira vez, o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de flores e frutos de *E. cinerea*. Além das propriedades antibacterianas e atividade antifúngica destes óleos essenciais, sugere-se uma promissora perspectiva para aplicações em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos.

No uso da medicina veterinária o efeito antiparasitário de pioelho de pombos em aves demonstrou que o produto com óleo essencial de *E. cinerea* pode ser eficaz, porém há necessidade de aprimorar os estudos.

É possível desenvolver uma formulação que incorpore o óleo essencial das folhas de *E. cinerea* e que esta formulação é capaz de se manter estável ao longo de pelo menos 6 meses.

Os resultados indicam que esta espécie vegetal apresenta um potencial químico-biológico na indústria com destino na área de farmácia, nutrição, cosmetologia, medicina veterinária entre outras áreas afins.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4. ed. Illinois: Allued Publishing Corporation, 2007.
- AGRAWAL, P.K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Ed. Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands, 1989.
- ALITONOU, G.; AVLESSI, F.; WOTTO, V.D.; AHOUSSE, E.; DANGOU, J.; SOHOUNHLOUÉ, D.C.K. Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. **Comptes rendus chimie**, v. 7, n. 10/11, p. 1051-1055, 2004.
- AMAKURA, Y.; UMINO, Y.; TSUJI, S.; ITO, H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; TONOGAI, Y. Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. **Food Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 47-56, 2002.
- AMEN-CHEN, C; PAKDEL, H.; ROY, C. Separation of phenols from *Eucalyptus* wood tar. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, n. 1/2, p. 25-37, 1997.
- ANTÔNIO, R.D. **Caracterização fitoquímica, morfoanatômica e atividades biológicas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch., Myrtaceae**. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**, 2007, 130 p.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Séries Temáticas: Cosméticos-Guia de estabilidade de Produtos Cosméticos**, v. 1, 2004, 47 p.
- APG II - Angiosperm Phylogeny Group. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.
- ASSAREH, M.H.; JAIMAND, K.; REZAEI, M.B. Chemical composition of the essential oils of six *Eucalyptus* species (Myrtaceae) from south west of Iran. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 1, p. 8-10, 2007.
- AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.
- BABU, G.D.K.; SINGH, B. Simulation of *Eucalyptus cinerea* oil distillation: A study on optimization of 1,8-cineole production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2/3, p. 226-231, 2009.
- BAIS, H.P.; WALKER, T.S.; STERMITZ, F.R.; HUFBAUER, R.A.; VIVANCO, J.M. Enantiomeric-Dependent Phytotoxic and Antimicrobial Activity of (±)-Catechin. A

Rhizosecreted Racemic Mixture from Spotted Knapweed. **Plant Physiology**, v. 128, p. 1173-1179, 2002.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125, 1991.

BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C.; CUTLER, D.; DITSCH, F.; MEUSEL, I.; THEISEN, I.; WILHELMI, H. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 126, n. 3, p. 237-260, 1998.

BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K.; KAUR, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.

BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; SETIA, N.; KAUR, S.; KOHLI, R.K. Chemical composition and inhibitory activity of essential oil from decaying leaves of *Eucalyptus citriodora*. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 61, n. 1/2, p. 52-56, 2006.

BEHRENS, A.; MAIE, N.; KNICKER, H.; KÖGEL-KNABNER, I. MALDI-TOF mass spectrometry and PSD fragmentation as means for the analysis of condensed tannins in plant leaves and needles. **Phytochemistry**, v. 62, n. 7, p. 1159-1170, 2003.

BERLYN, G.P.; MIKSCH, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa: Iowa University, 1976.

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. **Nature**. n. 181, p. 1199-1200, 1958.

BONA, C.; BOEGER, M.R.; SANTOS, G.O. **Guia ilustrado de anatomia vegetal**. Ribeirão Preto: Holos, 2004.

BOSCARDIN, P.M.D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage – Myrtaceae**. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BOSCARDIN, P.M.D.; FARAGO P.V.; NAKASHIMA T.; SANTOS P.E.T.; PAULA J.F.P. Estudo Anatômico e Prospecção Fitoquímica de Folhas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 94-101, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003.

BRITO, J.F.A.; ALQUINI, Y. A new method for staining botanical material embedded in glycol metacrilate (GMA). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 4, p. 949-951, 1996.

BUKUSNE, V.E.; DOMOKOS, J.; ERDOS, G.; FARKAS, E.; KALO-VASKO, D.; KECSKEMETI, I.; PALINKAS, J. Treatment of citronellal and *Eucalyptus citriodorata* essential oils with a strong macroporous acid from cationic resin in the presence of water to enhance insect repellency, due to raised p-menthane-diol concentrations. Patente número: HU200203986-A1, 2005.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CAMPBELL, S.J., OGLE, H.J., JOYCE, D.C. Glycerol uptake preserves cut juvenile foliage of *Eucalyptus cinerea*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 40, n. 3, p. 483-492, 2000.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 3, p. 264-269, 1995.

CAZES, J.; DEKKER, M. **Encyclopedia of Chromatography**. 2004 Update Supplement. Ed. Jack Cazes, 2004.

CERMELLI, C.; FABIO, A.; FABIO, G.; QUAGLIO, P. Effect of *eucalyptus* essential oil on respiratory bacteria and viruses. **Current Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 89-92, 2008.

CHENG, S.S.; HUANG, C.G.; CHEN, Y.J.; YU, J.J.; CHEN, W.J.; CHANG, S.T. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 452-456, 2009.

CHÉRAIF, I.; JANNET, H.B.; HAMMAMI, M.; KHOUJA, M.L.; MIGHRI, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cupressus arizonica* Greene. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 813-820, 2007.

CHU, R. Body and mind-invigorating aromatic essential oil for use in yoga comprises rosemary, lemon, bergamot, patchouli, and *Eucalyptus globulus*. Patente número: CN101152295-A, 2008.

COELHO-DE-SOUZA, L.N.; LEAL-CARDOSO, J.H.; MATOS, F.J.A.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P.J.C. Relaxant effects of the essential oil of *Eucalyptus tereticornis* and its main constituent 1,8-cineole on guinea-pig tracheal smooth muscle. **Planta Medica**, v. 71, n. 12, p. 1173-1175, 2005.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas, SP: UNICAMP, 1997.

CORK, S.J.; KROCKENBERGER, A.K. Methods and pitfalls of extracting condensed tannis and other phenolics from plants: insights from investigations on *Eucalyptus* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v. 17, n. 1, p. 123-134, 1991.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. 2.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1986. v. 1.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; GUSTAFSON, J.E.; WARMINGTON, J.R.; WYLLIE, S.G. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. **Molecules**, v. 6, n. 1, p. 87-91, 2001.

CREN-OLIVÉ, C.; WIERUSZESKI, J.M.; MAES, E.; ROLANDO, C. Catechin and epicatechin deprotonation followed by  $^{13}\text{C}$  NMR. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 25, p. 4545-4549, 2002.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

CZOCHANSKA, Z.; FOO, L. Y.; NEWMAN, R.H.; PORTER, L.J. Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I**, p. 2278-2286, 1980.

DE SOUZA CHAGAS, A.C.; CERQUEIRA LEITE, R.; TEIXEIRA PRATES, H. Anti parasite emulsifiable vegetable essential oil concentrate includes stabilised *eucalyptus* oil in e.g. soap and shampoo form. Patente número: BR200105955-A, 2004a.

DE SOUZA CHAGAS, A.C.; CERQUEIRA LEITE, R.; TEIXEIRA PRATES, H. Anti parasite emulsifiable vegetable essential oil concentrate includes stabilised

*eucalyptus* oil in e.g. soap and shampoo form. Patente número: BR200105957-A, 2004b.

DONATINI, R.S ; ISHIKAWA, T.; BARROS, S.B.M.; BACCHI, E.M. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 89-94, 2009.

ELAISSI, A.; CHRAIF, I.; BANNOUR, F.; FARHAT, F.; SEN SALAH, M.; CHEMLI, R.; KHOUJA, M.L. Contribution to the qualitative and quantitative study of seven *Eucalyptus* species essential oil harvested of Hajeb's Layoun arboreta (Tunisia). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 10, n. 1, p. 15-25, 2007.

ENGLER, A. **Syllabus der pflanzenfamilien**. Berlin: Gebruder, 1964.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 896-902, 2011.

ESTANISLAU, A.A.; BARROS, F.A.S.; PEÑA, A.P.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H., PAULA, J.R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-100, 2001.

FABROWSKI, F.J. ***Eucaliptus smithii* R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. 2002, 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2007.

FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I

FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. Parte II

FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

FARMACOPEIA Brasileira. São Paulo: Atheneu, 1996. Parte IV.

FIUZA, T.S.; REZENDE, M.H.; SABÓIA-MORAIS, S.M.T.; BARA, M.T.F.; TRESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 21-31, 2008.

FOSTER, A.S. **Practical plant anatomy**. New York: Van Nostrand, 1949.

FRANCO, J.; NAKASHIMA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição química e atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth.,

Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 191-194, 2005.

FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth., Myrtaceae**. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

FRIZZO, C.D. ***Baccharis uncinella* DC. y *Baccharis dracunculifolia* DC., um modelo para el estudio de técnicas de extracción y análisis de mezclas de componentes volátiles**. 144 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidad de La República, Montevideo, 2001.

GIAMAKIS, A.; KRETSI, O.; CHINOU, I.; SPYROPOULOS, C.G. *Eucalyptus camaldulensis*: volatiles from immature flowers and high production of 1,8-cineole and  $\beta$ -pinene by in vitro cultures. **Phytochemistry**, v. 58, n. 2, p. 351-355, 2001.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 731-737, 2010.

GLASL, V.H. Zur photometrie in der drogenstandardisierung. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 123, n. 42, p. 1979-1987, 1983.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUENTHER, E. Individual essential oils of the plant family Myrtaceae. *In: The Essential Oils*, 4. ed. New York: Van Nostrand, 1977. v. 4.

HAJJI, F.; FKI-H-TETOUANI, S.; TANTAOUI-ELARAKI, A. Antimicrobial activity of twenty-one *Eucalyptus* essential oils. **Fitoterapia**, v. 64, n. 1, p. 71-77, 1993.

HANAMANTHAGOUDA, M.S.; KAKKALAMELI, S.B.; NAIK, P.M.; NAGELLA, P.; SEETHARAMAREDDY, H.R.; MURTHY, H.N. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 836-839, 2010.

HÄNSEL, R.; KELLER, K.; RIMPLER, H.; SCHNEIDER, G. **Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis**. Berlin-Heidelberg: SpringerVerlag, 1992, v. 4.

HICKEY, L.J. Clasificación de la arquitectura de las hojas de dicotiledóneas. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 16, p. 1-26, 1974.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 565-573, 2001.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

JOHNSON, E.D. A comparison of the juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus*. **New Phytologist**, v. 25, n. 3, p. 202-212, 1926.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 12. ed. São Paulo: Nacional, 1998.

KARITA, T. Sleep inducing composition for treating disease e.g. insomnia, comprises geranyl acetate type *eucalyptus* oil and optionally an essential oil adsorbing material, essential oil adsorbing and desorbing agent, and absorption promoter. Patente número: US2006251743-A1, 2007.

KITAGAWA, Y. Aromatherapy products for reducing nicotine desire accompanying cessation of smoking or smoking reduction, contain essential oils of *eucalyptus*, rosemary and/or peppermint or their extracts. Patente número: JP2005272431-A, 2005.

KOEHLER, H.S. **Manual simplificado de uso do programa MSTATC**. Curitiba. UFPR/SCA. Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, 38 p., 1996.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JÚNIOR, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

KORVER, O.; WILKINS C.K. Circular dichroism spectra of flavanols. **Tetrahedron**, v. 27, n. 22, p. 5459-5465, 1971 apud RODRIGUES, J. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: Metodologia para estabelecimento de perfis quali e quantitativos para extratos vegetais**. 140 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

KOUPAI-ABYAZANI, M.R.; McCALLUM, J.; MUIR, A.D.; LEES, G.L.; BOHM, B.A.; TOWERS, G.H.N.; GRUBER, M.Y. Purification and characterization of a proanthocyanidin polymer from seed of alfafa (*Medicago sativa* Cv. Beaver). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 565-569, 1993.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 1997. 198 p.

KVITNITSKY, E.; BEN-ARIE, R.; PALUY, I.; SEMENENKO, O. Composition for protecting harvested fruits against decay caused by pathogenic fungi, contains essential oil or its components of *Cinnamon cassia*, mustard, thyme, nutmeg and *eucalyptus*. Patente número: WO2006080013-A2, 2006.

LEITE DENADAI, A.M.; DE FREITAS REIS, I.; REZENDE CALADO, C.; RIBEIRO DE FREITAS, M.; BARBOSA, G.J.; SOARES RIBEIRO, L. Set of insect repellent emulsions base on *Eucalyptus citrioca* essential oil consists of a mixture also containing surfactant and a mineral oil product, for use as spray. Patente número: BR200606042-A, 2008.



LIAPI, C.; ANIFANTIS, G.; CHINOU, I.; KOUROUNAKIS, A.P.; THEODOSOPOULOS, S.; GALANOPOULOU, P. Antinociceptive properties of 1,8-cineole and beta-pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. **Planta Medica**, v. 73, n. 12, p. 1247-1254, 2007.

LOPES, G.C.; MACHADO, F.A.V.; TOLEDO, C.E.M.; SAKURAGUI, C.M.; MELLO, J.C.P. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 925-931, 2008.

LUCIA, A.; AUDINO, P.G.; SECCACINI, E.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 3, p. 299-303, 2007.

MACHADO, M.; CECHINEL FILHO, V.; TESSAROLO, R.; MALLMANN, R.; SILVA, C.M.; CRUZ, A.B. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 7, p. 636-639, 2005.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; SILVA, R.A.; BARROS, R.S.; SOUSA, R.N.; SOUSA, L.C.; BRITO, E.S.; SOUZA-NETO, M.A. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 1, p. 1-7, 2010.

MALINOWSKI, L.R.L. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* subespécie *bicostata* (Maiden et al.) J. B. Kirkpat., Myrtaceae.** 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MALINOWSKI, L.R.L.; NAKASHIMA, T.; ALQUINI, Y. Caracterização morfoanatômica das folhas jovens de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *bicostata* (Maiden et al.) J.B. Kirkpat. (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 5, p. 756-761, 2009.

MANGIERI, H.R.; DIMITRI, M.J. **Los Eucaliptos em La Silvicultura.** Buenos Aires: Editorial Acme S.A.C.L., 1958. 226 p.

MARIN, D.; SONIE, S. Antistress composition, rapidly effective in combating acute stress crises, containing mint, *eucalyptus* and/or rose essential oil(s). Patente número: FR2859108-A1, 2005.

MELLO, J.C.P. **Untersuchung zur struktur der flavan-3-ol und proanthocyanidine aus der rinde von *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Mimosaceae).** 1995. 263 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia Farmacêutica e Fitoquímica, Universidade de Münster, Alemanha, 1995.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 807-813, 1996.

MENDES, S.; NUNES, D.S.; MARQUES, M.B.; TARDIVO, R.C.; CECHINEL FILHO, V.; SIMIONATTO, E.L.; WISNIEWSKI JUNIOR, A. Essential oil of *Baccharis semiserrata*, a source of spathulenol. **Publicatio UEPG**, v. 14, n. 3, p. 241-245, 2008.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Oxford: Claredon Press, 1950.

MONTAGU, K.D.; KEARNEY, D.E.; SMITH, R.G.B. The biology and silviculture of pruning planted eucalypts for clear wood production - a review. **Forest Ecology and Management**, v. 179, n. 1/3, p. 1-13, 2003.

MOREIRA, D.L.; LEITÃO, S.G.; GONÇALVES, J.L.S.; WIGG, M.D.; LEITÃO, G.G. Antioxidant and antiviral properties of *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae) and of quebracho (*Schinopsis* sp.) extracts. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 421-425, 2005.

MOREIRA, E.A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MOREIRA, E.A.; CECY, C.; NAKASHIMA, T.; FRANKE, T.A.; MIGUEL, O.G. O óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.v.M. aclimatado no estado do Paraná-Brasil. **Tribuna Farmacêutica**, v. 48, n. 1/2, p. 44-54, 1980.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 1061-1066, 2010.

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Atividades biológicas dos flavonoides naturais. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2. ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009.

NAKASHIMA, T. **Manual prático de fitoquímica**. Curitiba: Departamento de Farmácia - UFPR, 1993. 25 p.

NAVARRETE, P.; PIZZI, A.; PASCH, H.; RODE, K.; DELMOTTE, L. MALDI-TOF and <sup>13</sup>C NMR characterization of maritime pine industrial tannin extract. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 2, p. 105-110, 2010.

NEWMAN, R.H.; PORTER, L.J. Solid state <sup>13</sup>C-NMR studies on condensed tannins. In: HEMINGWAY, R.W.; LAKS, P.E. **Plant polyphenols: synthesis, properties, significance**. New York: Plenum Press, 1992, v. 59, p. 339-347.

NYFELER, F.; MOSER, U.K.; WALTER, P. Stereospecific effects of (+)- and (-)-catechin on glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 763, p. 50-57, 1983.

OGUNWANDE, I.A.; OLAWORE, N.O.; ADELEKE, K.A.; KONIG, W.A. Chemical composition of the essential oils from the leaves of three *Eucalyptus* species growing in Nigeria. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 297-301, 2003.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Farmacobotânica**: curso de identificação de drogas vegetais. São Paulo: Atheneu, 1987. 163 p.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, São Paulo, 1991.

OO, C.W.; KASSIM, M.J.; PIZZI, A. Characterization and performance of *Rhizophora apiculata* mangrove polyflavonoid tannins in the adsorption of copper (II) and lead (II). **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 152-161, 2009.

OTANI, S.; KONDO, Y.; ASADA, Y.; FURUYA, T.; HAMADA, H.; NAKAJIMA, N.; ISHIHARA, K.; HAMADA, H. Biotransformation of (+)-catechin by plant cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. **Plant Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 407-409, 2004.

PACHALY, J.R.; BRITO, H.F.V. Emprego do método de extrapolação alométrica no cálculo de protocolos posológicos para animais selvagens. **A Hora Veterinária**, v. 20, n. 118, p. 59-65, 2000.

PEREIRA, S.I.; FREIRE, C.S.R.; NETO, C.P.; SILVESTRE, A.J.D.; SILVA, A.M.S. Chemical composition of the essential oil distilled from the fruits of *Eucalyptus globulus* grown in Portugal. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 4, p. 407-409, 2005.

PHARMACOPOEA Helvetica. 7. ed. Berne: Département Fédéral de l'Intérieur, 1993.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantification of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: A review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 2/3, p. 127-149, 1988.

RUMYANTSEVA, L.A. *Eucalyptus cinerea* as a source of cineol. **Aptechnoe Delo**, v. 7, n. 5, p. 39-43, 1958.

SAKAI, K.; HAJI, S.; GOZU, Y.; MORIYAMA, M. Composition for use in skin external preparations, cosmetics and clothing for suppressing lipid storage and for treating obesity, contains essential oil selected from *eucalyptus* oil, *Laurus nobilis* oil or grapefruit oil. Patente número: JP2005187432-A, 2006.

SANDRI, I.G.; ZACARIA, J.; FRACARO, F.; DELAMARE, A.P.L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 823-828, 2007.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2003.

SANTOS, S.C.; WATERMAN, P.G. Polyphenols from *Eucalyptus ovata*. **Fitoterapia**. v. 72, n. 3, p. 316-318, 2001a.

SANTOS, S.C.; WATERMAN, P.G. Polyphenols from *Eucalyptus consideriana* and *Eucalyptus viminalis*. **Fitoterapia**. v. 72, n. 1, p. 95-97, 2001b.

SARTORELLI, P.; MARQUIORETO, A.D.; AMARAL-BAROLI, A.; LIMA, M.E.L.; MORENO, P.R.H. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 231-233, 2007.

SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: Iowa State College, 1951.

SCHMIDT, E.M.S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILLO, A.C. Patologia clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 9-20, 2007.

SERAFINO, A.; PIERIMARCHI, P.; ANDREOLA, F.; ZONFIRILLO, M.; MERCURI, L.; FEDERICI, M.; RASI, G.; SINIBALDI-VALLEBONA, P. Stimulatory effect of *eucalyptus* essential oil on macrophage/granulocyte phagocytic activity: *in vitro* and *in vivo* evidences. **EJC Supplements**, v. 4, n. 12, p. 159, 2006.

SERAFINO, A.; VALLEBONA, P.S.; ANDREOLA, F.; ZONFRILLO, M.; MERCURI, L.; FEDERICI, M.; RASI, G.; GARACI, E.; PIERIMARCHI, P. Stimulatory effect of *Eucalyptus* essential oil on innate cell-mediated immune response. **BMC Immunology**, v. 9, artigo 17, 2008.

SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos Essenciais: Potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2000.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003.

SLADE, D.; FERREIRA, D.; MARAIS, J.P.J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 66, n. 18, p. 2177-2215, 2005.

SKANDAMIS, P.; KOUTSOUMANIS, K.; FASSEAS, K.; NYCHAS, G.J.E. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. **Italian Journal of Food Science**, v. 13, n. 1, p. 65-75, 2001.

SKOOG, D.A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 95-100, 2005.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, W. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007. 357 p.

STEINBAUER, M.J.; SCHIESTL, F.P.; DAVIES, N.W. Monoterpenes and epicuticular waxes help female autumn gum moth differentiate between waxy and glossy *Eucalyptus* and leaves of different ages. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 6, p. 1117-1142, 2004.

SULTANA, S.; ALI, M.; ANSARI, S.H.; BAGRI, P. The effect of physical factors on chemical composition of the essential oil of *Eucalyptus citriodora* Hook. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 11, n. 1, p. 69-74, 2008.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 60-64, 2004.

TESSMANN, W.S. Natural fungicide useful for treatment of organic and biodynamic crops comprises a dispersion of essential oil of *Eucalyptus species*; natural emulsifier; and water in specific amount. Patente número: BR200603004-A; WO2008011699-A1, 2007.

TOLOZA, A.C.; ZYGADLO, J.; CUETO, G.M.; BIURRUN, F.; ZERBA, E.; PICOLLO, M.I. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 889-895, 2006.

TROPICOS. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>>. Acesso em: 20 abril 2011.

TRUGILHO, P.F.; MORI, F.A.; LIMA J.T.; CARDOSO, D.P. Determinação do teor de taninos na casca de *Eucalyptus* spp. **Cerne**, v. 9, n. 2, p. 246-254, 2003.

TSUNODA, E.; OSHIMA, T.; MAEDA, N. Antimicrobial composition useful for suppressing halitosis and preventing or reducing gum related disease, comprises mixture of essential oils e.g. peppermint oil, lemon oil, lemon grass oil and *Eucalyptus citriodora* oil. Patente número: JP2007169250-A, 2007.

TUFFI-SANTOS, L.D.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; MEIRA, R.M.S.A.; TIBURCIO, R.A.S.; FERREIRA, F.A.; MELO, C.A.D.; SILVA, E.F.S. Danos visuais e anatômicos causados pelo glyphosate em folhas de *Eucalyptus grandis*. **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p. 9-16, 2008a.

TUFFI-SANTOS, L.D.; THADEO, M.; IAREMA, L.; MEIRA, R.M.S.A.; FERREIRA, F.A. Foliar anatomy and histochemistry in seven species of *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 32, n. 4, p. 769-779, 2008b.

TYAGI, A.K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 228-235, 2011.

USHIROBIRA, T.M.A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L.M.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P. Chemical and Microbiological Study of Extract from Seeds of Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 5-9, 2007.

van VUUREN, S.F.; VILJOEN, A.M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. 6, p. 540-544, 2007.

VOIGT, G.L. **Conceptos y Técnicas Hematológicas para Técnicos Veterinarios**. Zaragoza: Editorial ACRIBIA, 2003.

WANG, C.K.; LEE, W.H.; PENG, C.H. Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1185-1188, 1997.

WAWER, I.; WOLNIAK, M.; PARADOWSKA, K. Solid state NMR study of dietary fiber powders from aronia, bilberry, black currant and apple. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 30, n. 2, p. 106-113, 2006.

WEBER, B.; HARTMANN, B.; STÖCKIGT, D.; KOHLENBERG, B.; SCHMIDT, C.O.; BERTRAM, H.J.; HÖLSCHER, B. Extensive study on the minor constituents of the essential oil of *Eucalyptus dives* Schau. type. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 6, p. 607-610, 2006.

WIRTHENSOHN, M.G.; SEDGLEY, M. Effect of pruning on regrowth or cut foliage stems of seventeen *Eucalyptus* species. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 38, n. 6, p. 631-636, 1998.

ZHU, B. In-mouth refreshing composition for use as month deodorant, comprises medium-chain fatty acid triglyceride, dipeptide type sweetening agent, refrigerant, peppermint essential oil, and eucalyptus essential oil. Patente número: WO2007094315-A1, 2008.

ZRIRA, S.; BESSIERE, J.M.; MENUT, C.; ELAMRANI, A.; BENJILALI, B. Chemical composition of the essential oil of nine *Eucalyptus* species growing in Morocco. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 172-175, 2004.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003.